

Morphologische Veränderungen in der Mausnetzhaut nach Ischämie / Reperfusion in verschiedenen genetisch veränderten Mauslinien

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.
an der Medizinischen Fakultät der
Universität Leipzig

eingereicht von:	Ina Frommherz
Geburtsdatum/-ort:	07.09.1979, Leipzig
angefertigt am/in:	01/2011-09/2013, Leipzig
Betreuer:	Prof. Dr. med. habil. Andreas Reichenbach Prof. Dr. rer. nat. habil. Antje Grosche, geb. Wurm

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 29. April 2014

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
BIBLIOGRAPHISCHE ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG.....	2
1.1. Die Retina.....	3
1.2. Die Müllerzelle.....	5
1.3. Das Hirn- und Netzhautödem	6
1.4. Volumenhomöostase der Retina	8
1.5. Die glutamaterg-purinerge Signalkaskade.....	9
1.6. Die Mausmodelle.....	10
1.6.1. dnSNARE-Mäuse	10
1.6.2. P2Y ₁ -defiziente Mäuse	13
1.6.3. IP ₃ R2-defiziente Mäuse	14
1.7. Zielsetzung der Doktorarbeit	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1. Versuchstiere	16
2.2. Das Ischämie-Reperfusions-Modell.....	16
2.3. Isolation des Auges und Präparation der Retina	17
2.4. Einbettung der Retina in Agarosegel.....	18
2.5. Vibratomschnitte der Retina	18
2.6. Immunhistochemie und Färbemethoden	19
2.7. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)-Assay zur Detektion der Apoptoserate	20
2.8. Darstellung der Retina mittels Laser-Scanning-Mikroskop	21
2.9. Quantifizierung der Zellzahl und statistische Analyse	22
3 ERGEBNISSE.....	23
3.1. Untersuchungen an Augen von Tieren mit monogener Expression des tTA- bzw. TSL-Transgens	24
3.2. Effekt der Überexpression von dominant negativem SNARE-Protein in dnSNARE-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen.....	26
3.2.1. Die Ganglienzellschicht (GZS)	27
3.2.2. Die innere Körnerzellschicht (IKS).....	28

3.2.3. Die äußere Körnerzellschicht (ÄKS)	29
3.2.4. Die innere plexiforme Schicht (IPS).....	29
3.2.5. Veränderung der Zellzahl nach Ischämie	30
3.3. Effekt des Defizits des P2Y ₁ -Rezeptors im Ischämie/ Reperusionsmodell im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen	31
3.3.1. Die Ganglienzellschicht (GZS)	31
3.3.2. Die innere Körnerzellschicht (IKS).....	32
3.3.3. Die äußere Körnerzellschicht (ÄKS)	33
3.3.4. Die innere plexiforme Schicht (IPS).....	34
3.4. Effekt der Abwesenheit des IP ₃ -Rezeptor Typ2 (IP ₃ R2 ^{-/-}) auf die Degeneration retinaler Zellen nach Ischämie/Reperfusion der Netzhaut	35
3.4.1. Die Ganglienzellschicht (GZS)	36
3.4.2. Die innere Körnerzellschicht (IKS).....	37
3.4.3. Die äußere Körnerzellschicht (ÄKS)	37
3.4.4. Die innere plexiforme Schicht (IPS).....	38
3.5. Vergleich von IP ₃ -Rezeptor Typ2-defizienten- und P2Y ₁ -defizienten- Mäusen	39
3.6. Bestimmung der Apoptoserate mittels TdT (TUNEL)-Assay in IP ₃ - Rezeptor Typ2-defizienten und P2Y ₁ -defizienten-Mäusen.....	43
4 DISKUSSION	47
4.1. Effekt der transgenen Überexpression von dnSNARE in Müllerzellen im Ischämie/Reperusionsmodell.....	48
4.2. Effekt des P2Y ₁ -Rezeptor-Defizits auf die Morphologie der Retina	50
4.3. Vergleich von IP ₃ Rezeptor Typ2- und P2Y ₁ -defizienten Mäusen im Ischämie/ Reperusionsmodell	52
5 ZUSAMMENFASSUNG	56
6 LITERATURVERZEICHNIS	59
ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT	68
DANKSAGUNG	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Struktureller Aufbau der Retina.....	4
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Mechanismen zur vesikulären Transmitterfreisetzung.....	12
Abbildung 3	Schematische Darstellung der volumenregulatorischen glutamaterg-purinergen Signalkaskade in Müllerzellen der Maus.....	13
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Netzhautpräparation.....	18
Abbildung 5	Repräsentativer immunhistologisch aufgearbeiteter Schnitt zur Visualisierung der Zellkerne in den verschiedenen Schichten der Netzhaut.....	24
Abbildung 6	(A) Darstellung der Zellzahl in Ganglienzellschicht , innerer und äußerer Körnerzellschicht im tTA-, TSL- und Wildtyp-Kontrollauge.....	25
	(B) Vergleich der Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht im tTA-, TSL- und Wildtyp-Kontrollauge.....	25
Abbildung 7	Exemplarische Schnitte von Kontroll- und postischämischen Netzhäuten aus Wildtyp- und dnSNARE-Mäusen.....	26
Abbildung 8	Quantitative Darstellung der Zellzahl der Ganglienzellschicht im Vergleich von dnSNARE-Mäusen mit Wildtyp-Mäusen.....	27
Abbildung 9	Quantitative Darstellung der Zellzahl der inneren Körnerzellschicht im Vergleich von dnSNARE-Mäusen mit Wildtyp-Mäusen.....	28
Abbildung 10	Quantitative Darstellung der Zellzahl der äußeren Körnerzellschicht von dnSNARE- und Wildtyp-Mäusen.....	29
Abbildung 11	Vergleich der Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht von dnSNARE- und Wildtyp-Mäusen.....	30
Abbildung 12	Quantitative Darstellung der Zellzahl in der Ganglienzellschicht im Vergleich von P2Y ₁ -defizienten-Mäusen und Wildtyp-Mäusen.....	32
Abbildung 13	Quantitative Darstellung der Zellzahl der inneren Körnerzellschicht im Vergleich von P2Y ₁ -defizienten-Mäusen und Wildtyp-Mäusen.....	33
Abbildung 14	Quantitative Darstellung der Zellen der äußeren Körnerzellschicht im Vergleich von P2Y ₁ -defizienten -Mäusen und Wildtyp-Mäusen.....	34
Abbildung 15	Vergleich der Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht von P2Y ₁ -defizienten-Mäusen und Wildtyp Mäusen.....	35
Abbildung 16	Quantitative Darstellung der Zellzahl der Ganglienzellschicht im Vergleich von IP ₃ R2-defizienten-Mäusen und Wildtyp-Mäusen.....	36
Abbildung 17	Zellzahl der inneren Körnerzellschicht (IKS) im Vergleich von IP ₃ R2-defizienten-Mäusen und Wildtyp-Mäusen.....	37
Abbildung 18	Zellzahl der äußeren Körnerzellschicht im Vergleich von IP ₃ R2-defizienten-Mäusen und Wildtyp-Mäusen.....	38
Abbildung 19	Vergleich der Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht von IP ₃ R2-defizienten-Mäusen und Wildtyp-Mäusen.....	39
Abbildung 20	Zellzahl der Ganglienzellschicht nach Ischämie bei Defizit des P2Y ₁ -Rezeptors, Defizit des IP ₃ -Rezeptor und im Wildtyp im Vergleich zum unbehandelten Kontrollauge.....	40

Abbildung 21	Zellzahl der inneren Körnerzellschicht nach Ischämie bei Defizit des P2Y ₁ -Rezeptors, Defizit des IP ₃ -Rezeptor und im Wildtyp im Vergleich zum unbehandelten Kontrollauge.....	41
Abbildung 22	Zellzahl der äußeren Körnerzellschicht nach Ischämie bei Defizit des P2Y ₁ -Rezeptors, Defizit des IP ₃ -Rezeptor und im Wildtyp im Vergleich zum unbehandelten Kontrollauge.....	42
Abbildung 23	Dicke der inneren plexiformen Schicht nach Ischämie bei Defizit des P2Y ₁ -Rezeptors, Defizit des IP ₃ -Rezeptor und im Wildtyp im Vergleich zum unbehandelten Kontrollauge.....	43
Abbildung 24	Repräsentativer Netzhautschnitt zur Visualisierung der Apoptose mittels TUNEL-Assay im Wildtyp- und P2Y ₁ -defizienten Tier.....	44
Abbildung 25	Darstellung der Apoptose-Rate der inneren und äußeren Körnerzellschicht.....	44
Abbildung 26	Schematische Zusammenfassung der Auswirkung der Ischämie in den untersuchten Mausmodellen.....	55
Tabelle 1	Prozentuale Veränderung der Zellzahl (GZS, IKS, ÄKS) und der Schichtdicke (IPS) nach Ischämie im Vergleich zum unbehandelten Kontroll-Auge.....	31
Tabelle 2	Darstellung der absolute Apoptose-Rate in innerer und äußerer Körnerzellschicht.....	45

Bibliographische Zusammenfassung

Frommherz, Ina

Morphologische Veränderungen in der Mausnetzhaut nach Ischämie/ Reperfusion in verschiedenen genetisch veränderten Mauslinien

Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Dissertation

67 S., 65 Lit., 26 Abb., 2 Tab., 3 Anlagen

Referat

Müllerzellen - die dominierenden Gliazellen der Netzhaut - üben vielfältige Funktionen und Aufgaben im retinalen „Zellnetzwerk“ aus. Ihre wohl wichtigste Funktion ist die Aufrechterhaltung der Volumen- und Ionenhomöostase der Retina. Forschungsergebnisse der letzten Jahre deuten darauf hin, dass pathologische Veränderungen in der Volumenregulation von Müllerzellen bei vielen Erkrankungen der Netzhaut eine bedeutende Rolle spielen.

Diese Promotionsarbeit befasst sich mit morphologischen Veränderungen in der Netzhaut von Wildtypmäusen sowie von drei Mausstämmen mit genetischen Veränderungen (Überexpression von dnSNARE, P2Y₁-defizient, IP₃-R2-defizient) unter pathologischen Bedingungen. In den experimentellen Untersuchungen fand das in Vorarbeiten bereits etablierte Ischämie-Reperfusions-Modell Anwendung. Es ist bekannt, dass Müllerzellen nach retinaler Ischämie Veränderungen durchmachen, die als reaktive Gliose bezeichnet werden. Reaktive Müllerzellen sind nicht mehr in der Lage, bestimmte Funktionen zu erfüllen, die sie in der gesunden Netzhaut haben, dazu gehört eine Einschränkung der Fähigkeit zur Volumenregulation. Ziel der Arbeit war es erstens, eine Charakterisierung der Mausnetzhäute hinsichtlich der zellulären Zusammensetzung der Retina vorzunehmen und zweitens zu untersuchen, inwiefern sich eine Störung der Müllerzellfunktion – wie sie bei allen drei genetisch veränderten Mauslinien vorliegt – auf das Überleben der Nervenzellen unter extremen Stressbedingungen wie z.B. einer Ischämie auswirkt. Denn gerade unter den mit einer Ischämie einhergehenden Bedingungen sollte die Funktion der Müllerzellen zum Erhalt der retinalen Ionen- und Volumenhomöostase von entscheidender Bedeutung sein.

1 Einleitung

Gemäß den Angaben des statistischen Bundesamts zählen Herz-Kreislaufkrankungen, speziell ischämische Durchblutungsstörungen, zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Folge der Minderperfusion der zu versorgenden Organe und Gewebe ist die Beeinträchtigung der entsprechenden Organ- und Gewebefunktion. Zerebrale Durchblutungsstörungen, welche aufgrund von Störungen im Versorgungsgebiet einzelner Hirnarterien entstehen, führen in dem betroffenen Gebiet häufig zu temporären oder permanenten, teilweise erheblichen Funktionsausfällen. Die Ischämie von Nervengewebe wie z.B. bei einem ischämischen Hirninsult kann je nach Dauer und Ausprägung über einen akuten Verlust neuronaler Zellen (Nekrose) und/ oder über den programmierten Zelltod (Apoptose) zu entsprechenden Gewebeschädigungen und den daraus resultierenden motorischen und/ oder sensiblen Funktionsdefiziten führen. Vergleichbar mit dem zerebralen Hirnödem, kann es bei retinalen Ischämien zum Auftreten von Netzhautödemen mit der Folge von unterschiedlich stark ausgeprägten Sehstörungen oder dem totalen Sehverlust kommen. Der Mechanismus der Entstehung des Hirn- sowie des Netzhautödems ist bisher nicht genau geklärt. Es werden zwei Formen der Ödembildung unterschieden. Flüssigkeit kann sich im Extrazellulärraum (extrazelluläres Ödem) als auch in den Zellen (zytotoxisches Ödem) ansammeln, bei letzter Form sind in der Netzhaut die Gliazellen involviert (Bringmann et al., 2005). Aus neueren Untersuchungen weiß man, dass Müllergliazellen, als der dominierende Gliazelltyp der Netzhaut, unter anderem eine bedeutende Rolle in der Volumen- und Ionenhomöostase der Retina spielen (Bringmann et al., 2006). Voraussetzung zur Erfüllung dieser Funktion ist eine effiziente Volumenregulation der Müllerzelle selbst, welche durch das Vorhandensein spezieller Transporter und Ionenkanäle in der Zellmembran der Müllerzellen realisiert wird. Nur dadurch ist es den Müllergliazellen möglich ihrer Funktion, dem Erhalt der Volumen- und Ionenhomöostase der Netzhaut, gerecht zu werden. Ein Funktionsverlust der Müllergliazellen, wie er infolge einer retinalen Ischämie auftreten kann, führt über eine Störung der zelleigenen Homöostase zu einem Anschwellen der Gliazellen und zu einer gestörten retinalen Ionen- und Volumenhomöostase (Bringmann et al., 2006). Folge kann die Neurodegeneration von Netzhautzellen sein.

1.1. Die Retina

Die Retina ist spezialisiertes Nervengewebe, welches die Innenseite des hinteren Augenabschnittes auskleidet. Sie ist vergleichbar mit einem leistungsstarken „Bildprozessor“, welcher die Umwandlung von Lichtreizen in elektrisch kodierte Signale des Sehnervens vermittelt, bevor diese an höhere Zentren des Gehirns weiter geleitet werden. Embryologisch geht die Netzhaut aus einer Ausstülpung des Zwischenhirnbodens hervor und wird damit entwicklungsbiologisch dem Zentralnervensystem zugeordnet (Reichenbach, 1999). Wissenschaftlich betrachtet, bietet die Retina den Vorteil, dass sie von außen sehr gut zugänglich ist, ihr struktureller Aufbau und ihre Funktionen bereits gut erforscht sind und sie infolgedessen von zahlreichen Wissenschaftlern als Modell für Untersuchungen des Zentralnervensystems genutzt wird (Reichenbach, 2008). Histomorphologisch weist die Retina eine lichtmikroskopisch gut erkennbare typische Schichtung mit abwechselnd zellkernreichen und –armen Lagen auf. In den verschiedenen Schichten findet man charakteristische Zelltypen und subzelluläre Kompartimente. In Abbildung 1 ist schematisch der Aufbau der Retina dargestellt. Sieben Schichten können unterschieden werden, wovon drei Schichten (GZS, IKS und ÄKS) die Zellkörper der Nervenzellen enthalten und in zwei Schichten (IPS, ÄPS) die synaptischen Verbindungen zwischen den verschiedenen Neuronen liegen. Entwicklungsbedingt ist die Wirbeltierretina invers angelegt, was die Lage der Photorezeptoren auf der lichtabgewandten Seite zur Folge hat (siehe Abb.1) und dazu führt, dass einfallendes Licht erst das gesamte retinale Gewebe durchdringen muss, bevor es auf die Photorezeptoren trifft. Funktionell und strukturell werden zwei Klassen von Lichtsinneszellen unterschieden, die Stäbchen und die Zapfen. Die lichtsensitiven Zellen, deren Zellkörper die äußere Körnerzellschicht formen, bilden das erste Neuron der Sehbahn und wandeln die eintreffenden Lichtreize in elektrische Signale um. Nachfolgend werden die Nervenimpulse über komplexe Schaltkreise verschiedener Arten von Interneuronen einer ersten Weiterverarbeitung unterzogen. Zu diesen Interneuronen zählen die Bipolarzellen (2. Neuron), die Horizontalzellen und die Amakrinen Zellen. In der inneren plexiformen Schicht sind die Bipolarzellen mit den Ganglienzellen über Synapsen verschaltet. Die Ganglienzellen - als drittes Neuron der Sehbahn - leiten die kodierte visuelle Information über ihre Axone im Sehnerven (Nervus opticus) an die visuellen

Zentren im Gehirn. Zusätzlich zu den bereits genannten Neuronen gibt es in der Retina - wie auch im gesamten übrigen ZNS - sogenannte Gliazellen. Sie wurden von Rudolf Virchow bereits vor mehr als 150 Jahren beschrieben. Man differenziert die Neuroglia in Mikro- und Makroglia, zu letzterer zählen in der Retina Astrozyten und Müllerzellen. Astrozyten sind an der Innenseite der Ganglienzellschicht lokalisiert, während Müllerzellen die gesamte Dicke der Retina (siehe Abb.1) durchziehen (Reichenbach und Bringmann 2010).

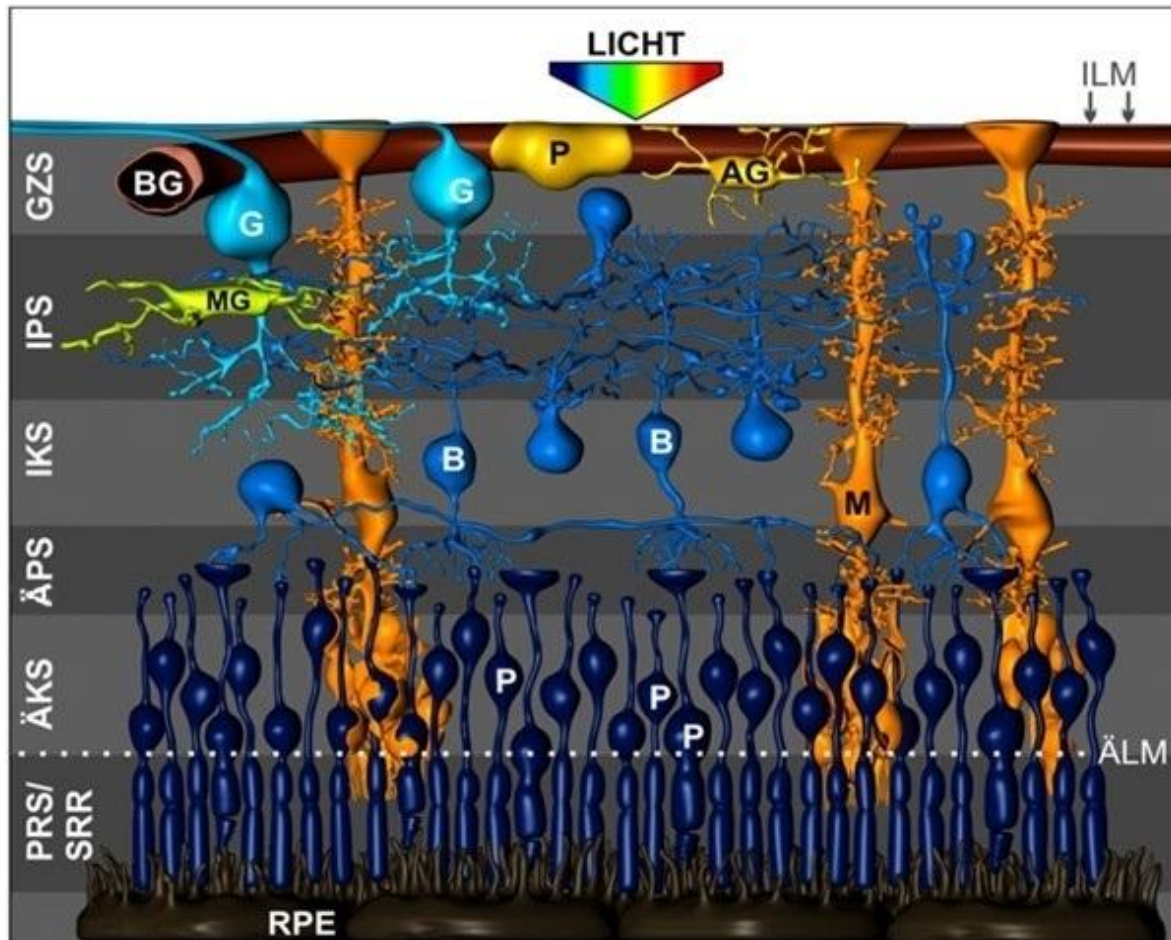


Abbildung 1 Struktureller Aufbau der Retina. Schematische Darstellung der zellulären Zusammensetzung der Netzhaut. Die Zellkörper der retinalen Neuronen (blau) ordnen sich in drei nukleären Schichten an – der Ganglienzellschicht (GZS), der inneren Körnerzellschicht (IKS) und der äußeren Körnerzellschicht (ÄKS). In letzterer Schicht liegen dicht gepackt die Somata der lichtsensitiven Photorezeptoren (P). Die synaptischen Kontakte zur Informationsweiterleitung zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen (B) sowie zwischen Bipolarzellen und Ganglienzellen (G) werden in den äußeren bzw. inneren plexiformen Schichten (ÄPS, IPS) gebildet. Die Somata der Müllerzellen (orange) liegen in der inneren Körnerzellschicht (IKS). Neben Müllerzellen als wichtigste Makrogliazellen der Netzhaut gibt es in der vaskularisierten Netzhaut Astrozyten (AG, nur in der GZS lokalisiert) sowie Mikroglia (MG, immunkompetente Zellen der Netzhaut), die primär in den plexiformen Schichten zu finden sind. ÄLM, äußere limitierende Membran = siebartige Platte aus Gliafortsätzen, die von den Photorezeptoren durchbrochen wird; ILM, innere limitierende Membran = Abgrenzung der Retina zum Glaskörper hin; RPE, retinales Pigmentepithel = Versorgungsschicht der Retina; PRS, Photorezeptorsegmente; SRR, Subretinalraum. BG, Blutgefäß. Die mit P bezeichnete gelbe Zelle in der GZS ist ein Perizyt. (Abb. Dr. Jens Grosche).

1.2. Die Müllerzelle

In der Netzhaut nehmen Müllerzellen als dominierende und retinaspezifische Makroglia die Funktionen und Aufgaben der Gliazellen wahr, die im zentralen Nervensystem von Astrozyten und Ependymozyten vermittelt werden. Sie wurden erstmals von dem Anatomen Heinrich Müller beschrieben und nach ihm benannt. Aufgrund der guten Zugänglichkeit der Retina wird die Müllerzelle gern als „Modell-Glia“ zur Untersuchung glialer Funktionen des Gehirns genutzt (Reichenbach, 1999). Diese Radialgliazellen, deren Somata in der inneren Körnerzellschicht liegen, durchspannen die gesamte Retina und umhüllen mit ihren scheidenbildenden Fortsätzen Bipolarzellen, Amakrine Zellen und Photorezeptoren. Zudem haben sie zwei schlauchförmige Stammfortsätze. Der innere Stammfortsatz bildet mit seinem konischen Endfuß die Verbindung zum Glaskörper, während der äußere die Somata der Photorezeptoren mit „blasenartigen“ Scheiden umgibt und zwischen den Photorezeptorsegmenten Mikrovilli aussendet (Reichenbach, 1999). Lange ging man davon aus, dass Gliazellen, in der Netzhaut insbesondere die Müllerzellen, hauptsächlich Stütz- und Haltefunktionen für das Nervengewebe erfüllen. Neuere Forschungsergebnisse haben jedoch die wichtige Rolle der Müllerzellfunktion für den zellulären Stoff- und Flüssigkeitstransport, für die Volumenhomöostase der Netzhaut, sowie die Steuerung neuronaler Prozesse aufgezeigt (Reichenbach 1999; Färber und Kettenmann 2005; Bringmann und Wiedemann 2012). Des Weiteren erkannten Franze et al. 2007, dass Müllerzellen neben ihrer Nervenzell-unterstützenden Funktion auch als Lichtkollektoren und Lichtleiter fungieren. Im Einzelnen ist die Bedeutung der Müllerzellen für die Stoffwechselvorgänge der Nervenzellen der Netzhaut durch folgende ihrer Funktionen gekennzeichnet. Müllerzellen nehmen zur eigenen Energieversorgung Glukose aus dem Blutkreislauf auf. Mit der Freisetzung der „Abfallprodukte“ (Pyruvat und Lactat) aus der zur eigenen Energiegewinnung genutzten Glykolyse, dienen Müllerzellen als Energielieferant für den oxidativen Stoffwechsel der Neuronen (Xu et al., 2007). Außerdem tragen Müllerzellen zum Transmitter-Recycling bei. Die von den Neuronen freigesetzten Transmitter Glutamat (erregend) und GABA (hemmend) werden von den Müllerzellen aktiv aufgenommen und durch das Enzym Glutaminsynthetase in das als Signalstoff unwirksame Glutamin umgewandelt. GABA wird zuvor durch die GABA-Transaminase in Glutamat umgewandelt. Das

Glutamin wird den Neuronen anschließend wieder zur Synthese von Glutamat und GABA bereitgestellt (Matsui et al., 1999). Eine der wohl wichtigsten Funktionen der Müllerzellen ist die Regulation der Ionen-, Flüssigkeits- und Volumenhomöostase der Netzhaut (Bringmann und Wiedemann 2012). Müllerzellen nehmen z.B. K^+ -Ionen, welche im Rahmen der neuronalen Erregung freigesetzt worden sind, aus dem Extrazellularraum auf und geben sie mit dem osmotisch folgenden Wasser an angrenzende flüssigkeitsgefüllte Kompartimente wie den Glaskörper oder Blutgefäße ab (Newman und Reichenbach 1996; Karwoski et al., 1989; Bringmann et al., 2006). Damit sorgen sie zum einen für einen gerichteten Flüssigkeitsabtransport aus der Netzhaut, regulieren zum anderen die extrazelluläre K^+ -Ionenkonzentration und ermöglichen damit eine repetitive Erregung unter Vermeidung einer neuronalen Übererregung (Newman und Reichenbach 1996).

Astrozyten und Müllerzellen reagieren auf pathologische Gewebeveränderungen mit reaktiver Gliose. Diese Reaktion ist unter anderem durch erhöhte Proliferation (tritt nur bei sehr starker Gewebeschädigung auf) (Sahel et al., 1990), durch eine gesteigerte Expression von GFAP und Vimentin (Ghosh et al., 2002) und besonders durch veränderte Ionentransporteigenschaften (Reichenbach, 1999) gekennzeichnet. Dies bedeutet im Speziellen eine Reduktion der für gesunde Müllerglia typischen hohen K^+ -Leitfähigkeit, infolgedessen eine Störung der zellulären Volumenregulation beobachtet wurde (Pannicke et al. 2004; Wurm et al. 2006).

1.3. Das Hirn- und Netzhautödem

Als Hirnödem bezeichnet man eine Schwellung des Gehirns durch eine intra- oder extrazelluläre Flüssigkeitsansammlung unterschiedlicher Genese, dessen mögliche Hauptkomplikation der Hirntod darstellt. Aufgrund verschiedenster pathologischer Prozesse (z.B. Hirntumore, Infektionen, Gefäßverschlüsse, Traumata) kommt es u.a. über eine Störung der Blut-Hirn-Schranke oder Blut-Liquor-Schranke zu einer intrakraniellen Druck- und Volumenzunahme, in deren Folge eine Kompression lebenswichtiger Strukturen (z.B. Atemzentrum) sowie

eine Ischämie des Nervengewebes resultieren (Dirnagl und Meisel, 1999; Kimelberg 1995; Papadopoulos et al., 2001).

Vergleichbar mit dem Hirnödem tritt in der Retina unter ischämisch-hypoxischen Bedingungen ein Netzhaut- oder Makulaödem auf (Yanoff et al. 1984). Ein Makulaödem ist eine umschriebene extrazelluläre Flüssigkeitsansammlung der Neuroretina im Bereich des Gelben Fleckes (Makula lutea), der Stelle des schärfsten Sehens der Netzhaut (Fovea centralis) und bedingt eine Visusminderung (Einschränkung der Sehkraft), die bis zum absoluten Verlust der Sehkraft reichen kann. Ophthalmoskopisch zeigen ödematöse Makulaareale meist eine sichtbare Verdickung der zentralen Netzhaut (Ferris und Patz 1984). Die Ursachen eines Makulaödems sind vielfältig und reichen von Diabetischer Retinopathie (Gardner et al., 1999), über verschiedene Formen der Uveitis bis hin zu postoperativ bedingten Ödemen der Retina. Einen wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung eines Makulaödems stellt die Kataraktoperation dar (Ulbig et al., 1993). Für die Entstehung eines Makulaödems spielen pathogenetisch betrachtet wiederum eine mit Unterversorgung einhergehende Durchblutungsstörungen der Netzhaut, oxidativer Stress sowie Entzündungsprozesse eine entscheidende Rolle. Die Bruch-Membran (Teil der Blut-Netzhaut-Schranke), welche durch Choroidea (Aderhaut) und retinales Pigmentepithel (RPE; siehe Abb. 1) gebildet wird, trägt durch eine Steigerung ihrer Permeabilität zur Entstehung des Ödems bei. Molekulare Hauptakteure sind hier Prostaglandine, Interleukine und verschiedene Wachstumsfaktoren z.B. TGF β und VEGF (Kampik und Grehn, 2008). Durch die Permeabilitätserhöhung der retinalen Blutgefäße und des Pigmentepithels erfolgt eine Flüssigkeitsansammlung im subretinalen Raum und im Gewebe der Fovea. Dies bewirkt eine Kompression von Gefäßen und Neuronen, was wiederum zur Hypoxie des Gewebes und potentiell zu einer Ablation der Netzhaut –einer Ablösung der Neuroretina vom versorgenden Pigmentepithel- führt (Grehn 2008).

Eine besondere Form des Netzhautödems ist das zystoide Makulaödem, welches auf der Basis intrazellulärer Flüssigkeitsansammlung in Müllerzellen entsteht (Kampik und Grehn, 2008). Charakteristisch sind hier große Zysten in der inneren Körnerzell- und der äußeren plexiformen Schicht, die das Ergebnis

angeschwollener und letztendlich abgestorbener Müllerzellen infolge vaskulärer Veränderungen darstellen (Fine und Brucker 1981, Yanoff et al. 1984).

1.4. Volumenhomöostase der Retina

Zu den wichtigsten Funktionen von Müllerzellen zählt –wie bereits erwähnt- die Aufrechterhaltung der Volumenhomöostase der Netzhaut, welche für die neuronale Informationsverarbeitung von immenser Bedeutung ist. Voraussetzung für die Umsetzung dieser Homöostasefunktion ist eine effiziente Volumenregulation der Müllerzelle selbst (Kofuji und Newman 2004). Hier spielt das Vorhandensein spezieller Kalium-Ionen-Kanäle in der Zellmembran der Müllerzellen, den sogenannten einwärtsgerichtenden Kir-Kanälen eine bedeutende Rolle. Mit Hilfe dieser Kanäle kann der Ein- und Ausstrom von extrazellulärem Kalium mit dem Ziel der Erhaltung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration gesteuert werden (Newman und Reichenbach 1996). Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass es verschiedene Typen von Kir-Kanälen gibt (Raap et al. 2002). Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit der Volumenregulation von Müllerzellen ist das Kanal-Protein Kir4.1, da dieses Protein besonders an den glialen Kontaktstellen zu Glaskörper und Blutgefäßen exprimiert wird (Nagelhus et al. 1999). Des Weiteren werden in diesen Bereichen Aquaporine (AQP) ko-exprimiert. AQP sind Transmembranproteine, die die Aufnahme und den Transport von Wasser und kleineren Molekülen ins Zellinnere bzw. auch deren Freisetzung regulieren. In bisherigen Untersuchungen konnten verschiedene Subtypen identifiziert werden. In Gliazellen findet sich vornehmlich AQP-4. Die Ko-Lokalisation der beiden Kanäle, Kir4.1 und AQP-4, legt die Vermutung nahe, dass der Wassertransport in der Retina an K^+ -Ströme gekoppelt sein könnte (Nagelhus et al. 1999). Somit erfüllen die AQP-4 vornehmlich ihre Funktion in der Aufnahme von an K^+ -gekoppeltem Wasser in die Müllergliazelle und ermöglichen somit auch eine Stabilisierung des extrazellulären Kaliumgleichgewichtes, wodurch wiederum ein konstantes Membranpotential der Nervenzellen gewährleistet wird.

Eine Störung der Müllerzellfunktion in der pathologisch veränderten Netzhaut kann über den Funktionsverlust der Volumenregulation der Müllerzellen zu Ödemen der

Retina führen. Pannicke et al. konnten bereits 2004 zeigen, dass es in postischämischen Netzhäuten –im Gegensatz zu Kontrollnetzhäuten- unter hypotonen Bedingungen zu einem Anschwellen der Müllerzellen kommt. Postischämisch imponiert eine Reduktion der K^+ -Leitfähigkeit der Müllerzellen durch Herunterregulation der Kir4.1-Expression im Bereich der Grenzflächen zu Blutgefäßen und dem Glaskörper, während die Zahl der AQP-4 nahezu unverändert bleibt. Der durch Kir2.1-Kanäle bewirkte K^+ -Einstrom bleibt ebenso unverändert. Aufgrund der verminderten Kir4.1-Expression kann keine ausreichende Abgabe der intrazellulären K^+ -Ionen erfolgen. Es entsteht ein osmotischer Gradient, der einen Wassereinstrom aus den Blutgefäßen in die Gliazellen begünstigt bzw. es kommt zur intrazellulären Akkumulation von K^+ -Ionen und Wasser – die Zellen schwellen an.

1.5. Die glutamaterg-purinerge Signalkaskade

Die Fähigkeit der Volumenregulation gliotisch veränderter Müllerzellen kann durch Aktivierung einer komplexen glutamaterg-purinergen Signalkaskade (siehe Abb. 3) wiederhergestellt werden. Dies geschieht unabhängig von der Expression der Kir4.1-Kanäle (Uckermann et al., 2005; Wurm et al., 2008).

Nach bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen stellt sich der Ablauf der glutamaterg-purinergen Signalkaskade wie folgt dar. Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) induzieren eine kalziumabhängige vesikuläre Freisetzung (Exozytose) von Glutamat aus Müllerzellen (Wurm et al., 2008; Slezak et al., 2012). Das Glutamat führt über die Stimulation metabotroper Glutamat-Rezeptoren zu einer Ausschüttung von endogenem ATP, welches durch das Enzym NTPDase2 zu ADP umgewandelt wird (Wurm et al., 2010). Nachfolgend stimuliert ADP den purinergen $P2Y_1$ -Rezeptor, was die Aktivierung der Phospholipase C_β mit Bildung der „second messenger“ Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) zur Folge hat. Daraus resultierend kommt es zu einem Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle nach dessen Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Hofman 2001). In einem nächsten Schritt wird Adenosin aus den Zellen freigesetzt, welches wiederum den Adenosin A1-Rezeptor aktiviert (Wurm et al., 2010 und 2011). Die Aktivierung dieses Rezeptors führt letztlich über eine Öffnung von Kalium- und Chloridkanälen

zur Hemmung einer möglichen Gliazellschwellung. Bisherige Forschungsergebnisse legen die Vermutung nahe, dass diese Signalkaskade in der Regulation des Müllerzellvolumens und damit für die Volumenhomöostase der Retina eine entscheidende Rolle spielt (Wurm et al., 2008). Durch Wurm et al. 2008 konnte der Nachweis erbracht werden, dass durch Aktivierung der glutamaterg-purinergen Signalkaskade die Volumenregulation gliotisch veränderter Müllerzellen im Ischämie-/ Reperfusionsmodell wiederhergestellt werden kann.

1.6. Die Mausmodelle

In meiner Arbeit wurden drei genetisch veränderte Mausmodelle genutzt, welche auch in bisherigen Untersuchungen bereits Anwendung fanden.

1.6.1. dnSNARE-Mäuse

dnSNARE-Mäuse sind transgene Mäuse, die durch den Eingriff an zwei Stellen im Genom geschaffen worden. Dabei wurde zum einen eine exogene dominant negativ-wirkende Domäne des SNARE-Proteins Synaptobrevin (TSL) exprimiert, die die vesikuläre Freisetzung von Transmittern unterdrückt/ beeinträchtigt indem es die korrekte Bildung des für die vesikuläre Freisetzung essentiellen SNARE-Komplexes stört (Pascual et al., 2005; siehe auch Abb. 2). Das zweite Transgen (tTA) ermöglicht eine zeitlich regulierbare und Gliazell-spezifische Expression des TSL-Transgens. Eine konventionelle (d.h. es wird von Beginn der Embryonalentwicklung an exprimiert) Expression des TSL-Transgens erwies sich in frühen Embryonalstadien als letal. Eine zeitlich definierte, postnatale Expression des TSL-Transgens wird erreicht, indem zunächst die Muttertiere während der Schwangerschaft und in der Stillphase Doxycyclin (unterdrückt die Aktivität des tTA-Transgens) über das Trinkwasser erhalten und somit über die Muttermilch an ihren Nachwuchs weiter geben. Erst wenn die Jungtiere abgesetzt werden, wird die Doxycylingabe unterbrochen, so dass das tTA-Transgen aktiv wird und damit die Expression des TSL-Transgens spezifisch in GFAP-exprimierenden Zellen initiiert. Bisherige Untersuchungen an dnSNARE-Mäusen (d.h. Tiere, die sowohl das tTA- als das TSL-Transgen tragen) konnten einen bedeutenden Einfluss der vesikulären Freisetzung von Transmittern (z.B. ATP oder Adenosin) aus

Astrozyten auf die synaptische Aktivität und damit auf das gesamte synaptische Netzwerk nachweisen (Pascual et al, 2005). Der Einfluss der Expression des dominant negativen SNARE-Proteins auf die Exozytose des Transmitters Glutamat wurde bereits untersucht. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass in Müllerzellen der dnSNARE-Mäuse die Volumenregulation gestört ist und der schwellungsinhibitorische Effekt von VEGF nicht mehr beobachtet werden kann (unveröffentlichte Daten). Dagegen konnte durch Applikation von Glutamat ein Anschwellen der transgen-exprimierenden Müllerzellen verhindert werden. Diese Befunde in Zusammenschau mit den pharmakologischen Daten früherer Studien (z.B. Wurm et al., 2008) deuten darauf hin, dass in der Tat eine vesikuläre Glutamatafreisetzung in der Volumenregulation der Müllerzellen eine Rolle spielt (siehe auch Abb. 3).

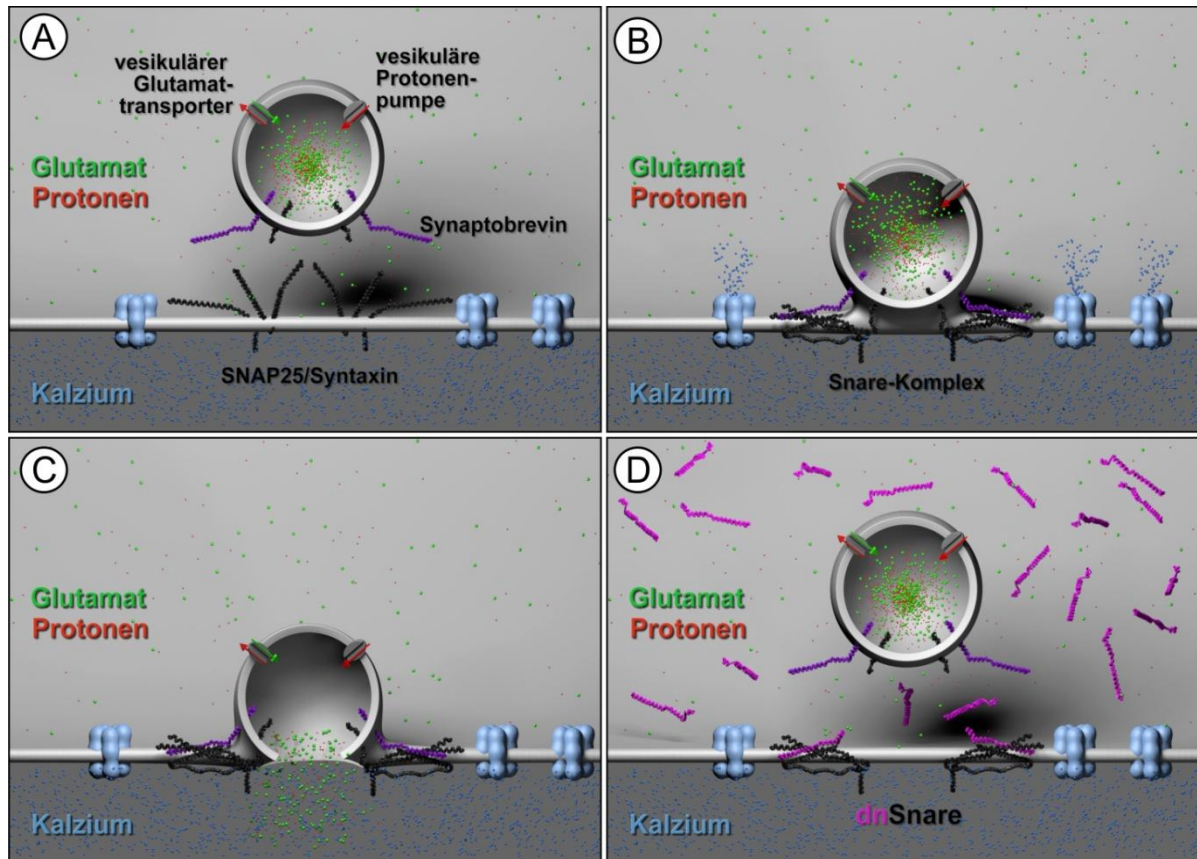


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Mechanismen zur vesikulären Transmitterfreisetzung. (A) Die Beladung des Vesikels mit Glutamat (grün) erfolgt durch den vesikulären Glutamattransporter, welcher Glutamat entgegen dessen Konzentrationsgradienten im Vesikel aufkonzentriert. Grundvoraussetzung dafür ist ein durch die vesikuläre Protonenpumpe aufrecht erhaltener Protonengradient. Das membranständige, vesikuläre Synaptobrevin bildet mit den Plasmamembran-ständigen SNARE-Proteinen SNAP25/Syntaxin den sogenannten SNARE-Komplex. (B) Dadurch wird das Vesikel an die Plasmamembran andockt. In Folge von Konformationsänderung von kalziumsensitiven Proteinen des SNARE-Komplexes kommt es bei einem intrazellulären Kalziumanstieg zur Fusion der Vesikel- und der Plasmamembran. (C) Glutamat wird in den Extrazellulärraum freigesetzt. (D) In dem verwendeten transgenen Mausmodell wird eine dominant negative cytosolische Domäne des Synaptobrevins (dnSNARE, rosa) überexprimiert. Diese bindet die Plasmamembran-ständigen Komponenten des SNARE-Komplexes und verhindert damit das Andocken der Vesikel an die Plasmamembran über das endogen exprimierte Synaptobrevin. Eine Vesikelfusion bzw. Transmitterfreisetzung bei intrazellulären Kalziumanstiegen wird damit unterbunden.

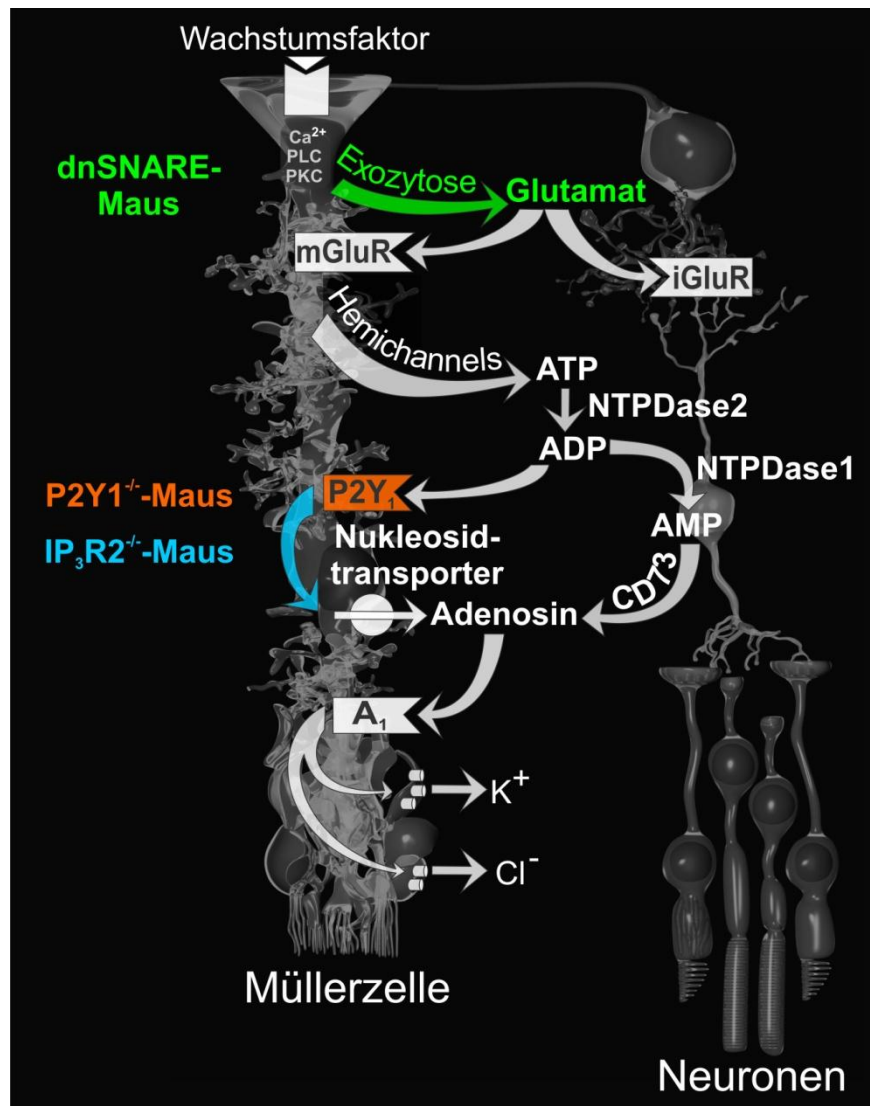


Abbildung 3 Schematische Darstellung der volumenregulatorischen glutamaterg-purinergen Signalkaskade in Müllerzellen der Maus. Basierend auf Daten eines komplexen pharmakologischen Versuchsansatzes und Experimenten an verschiedenen transgenen Mausmodellen zur Volumenregulation von Müllerzellen (Wurm et al., 2008; 2010; unveröffentlichte Daten) wurde der sequentielle Ablauf dieser Kaskade identifiziert und verifiziert. Farblich markiert sind Schlüsselstellen, die in den verschiedenen auch in meiner Doktorarbeit zum Einsatz kommenden Mausmodellen (*dnSNARE*-, *P2Y₁*^{-/-}-, *IP₃R2*^{-/-}-Maus) deletiert bzw. inaktiviert wurden.

1.6.2. *P2Y₁*-defiziente Mäuse

P2-Rezeptoren sind membranständige Rezeptoren, welche durch extrazelluläre Nukleotide wie ATP, ADP, UDP und UTP aktiviert werden. Man differenziert zwei Rezeptorsubtypen, die P2X- und P2Y-Rezeptoren. Erstere sind Liganden-gesteuerte Ionen-Kanäle, während letztgenannte zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Bisher konnten sieben verschiedene

P2X- und acht verschiedene P2Y-Rezeptoren identifiziert werden (von Kügelgen 2006). Der in der glutamaterg-purinergen Signalkaskade relevante P2Y₁-Rezeptor ist zudem in der glatten Muskulatur, in Endothelzellen, in Blutplättchen und eben in neuronalem Gewebe zu finden und spricht selektiv auf ADP an (von Kügelgen 2006 und 2008). In der Literatur sind bereits diverse Untersuchungen an P2Y₁-defizienten Mäusen hinsichtlich der Auswirkung des Rezeptordefizites auf unterschiedliche Erkrankungen beschrieben. So sch tzt das Fehlen der P2Y₁-Rezeptor-Funktion z.B. vor der Progression von Nierenerkrankungen und Nierenversagen (Hohenstein et al., 2007). Des Weiteren treten arterielle wie auch venöse Thrombosen bei Defizit des P2Y₁-Rezeptors seltener auf (Lenain et al., 2003). Auch konnte durch Untersuchungen an P2Y₁-defizienten Mäusen bereits die essentielle Bedeutung der glutamaterg-purinergen Signalkaskade für eine effiziente Volumenregulation der Müllerzellen nachgewiesen werden (Wurm et al. 2009; Wurm et al. 2010). In Tieren mit P2Y₁-Defizit wiesen Müllerzellen eine gestörte Volumenregulation trotz normaler Kaliumleitf higkeit auf (Wurm et al., 2010). Damit ist, ähnlich wie für die dnSNARE-Mäuse, gezeigt worden, dass die glutamaterg-purinerge Signalkaskade (neben der hohen Kaliumleitf higkeit der Müllerzellen) auch in ansonsten gesunden Müllerzellen essentiell für deren Volumenregulation ist.

1.6.3. IP₃R2-defiziente Mäuse

IP₃-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Kalziumkanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) führt über die Aktivierung des IP₃-Rezeptors zu einem  ffnen eines Kalziumkanals und zum schnellen Einstromen des Kalziums aus dem ER ins Zytosol.  ber die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration nehmen IP₃-Rezeptoren eine bedeutende Rolle in der Steuerung verschiedenster zellulärer Prozesse ein. IP₃ ist neben Diacylglycerin (DAG) eines der Produkte der Phospholipase C_ , die nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren (hier P2Y₁-Rezeptor) für die Bildung von IP₃ und DAG aus Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP₂) verantwortlich ist. Bisher wurden drei Subtypen von IP₃-Rezeptoren identifiziert: Typ 1 (= IP₃R1), Typ2 (= IP₃R2) und Typ3 IP₃-Rezeptor (= IP₃R3). Untersuchungen IP₃R2-defizienter Mäuse konnten bereits zeigen, dass es unter

hypoosmolaren Bedingungen zu einer unmittelbaren Gliazellschwellung kommt (Lipp et al., 2009; Wurm et al., 2010), was die Rolle dieses IP_3 -Rezeptorsubtypes für die Volumenregulation von Müllerzellen belegt.

1.7. Zielsetzung der Doktorarbeit

Wie im Abschnitt 1.6 erläutert ist aus Vorarbeiten meiner Arbeitsgruppe bekannt, dass in allen in meiner Doktorarbeit verwendeten Mauslinien die Volumenregulation von Müllerzellen nicht mehr korrekt funktioniert. Genau diese ist aber wichtig um den Flüssigkeitsabtransport aus der Netzhaut und den Ausgleich von überschießenden Ionenkonzentrationen bei verstärkter Nervenzellaktivität sicher zu stellen. Allerdings ist die Netzhaut in allen drei Mausmodellen in der unbehandelten Kontrolle histologisch-morphologisch normal verglichen mit der Netzhaut aus entsprechenden Wildtyptieren. Quantitative Daten zu den tatsächlichen Zellzahlen in den einzelnen Schichten der Netzhaut wurden allerdings noch nicht erhoben, so dass mögliche moderate Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung der Netzhaut in diesen Tieren noch nicht weiterführend untersucht worden sind. Entsprechend ist ein erstes Ziel meiner Doktorarbeit eine solche detaillierte Charakterisierung an den Netzhäuten der einzelnen Mauslinien vorzunehmen.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die eingeschränkte Müllerzellfunktion, bedingt durch das Fehlen vom $P2Y_1$ -Rezeptor, IP_3 -Rezeptor bzw. der Expression des dominant negativen SNARE-Proteins, sich auf das Überleben von Nervenzellen unter extremen Stressbedingungen, wie z.B. einer Ischämie, auswirkt. Gerade unter diesen Bedingungen der mit einer Ischämie einhergehenden neuronalen Übererregung und exzessiver Kaliumfreisetzung in den Extrazellulärraum sollte die Funktion der Müllerzellen zum Erhalt der retinalen Ionen- und Volumenhomöostase von entscheidender Bedeutung sein. Entsprechend war ein weiteres Ziel meiner Arbeit die Neurodegeneration in einem Modell für retinale Ischämie/Reperfusion in allen drei Mauslinien ($P2Y_1^{-/-}$, $IP_3R2^{-/-}$ und dnSNARE) mit eingeschränkter Müllerzellfunktion zu analysieren und mit der Situation im Wildtyptier zu vergleichen.

2 Material und Methoden

Alle Untersuchungen wurden im Rahmen der DFG-finanzierten Forschergruppe FOR748 "Neuronal and glial P2 receptors - molecular basis and functional significance" im Teilprojekt 6 „Expression, function and interaction of purinergic receptor subtypes on glial cells of the retina“ der Universität Leipzig am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung Pathophysiologie der Neuroglia, durchgeführt.

2.1. Versuchstiere

Es wurden ausschließlich Mäuse der Mauslinien $P2Y_1^{-/-}$, $IP_3R2^{-/-}$ (verglichen mit 129Sv-Wildtyp-Tieren) und dnSNARE (verglichen mit C57Bl6-Wildtyp-Tieren) verwendet. Die Zucht der Tiere erfolgte am Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Universität Leipzig. Es wurden sowohl weibliche und männliche Tieren untersucht. Die Analyse erfolgte jeweils an 4-8 Mäusen, welche jeweils ca. 8 Monate alt waren. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen mit strenger Einhaltung des Zwölf-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus und Zugang zu Futter und Wasser ad libitum. Alle Versuche wurden gemäß den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Um vitale Netzhautpräparate zu gewinnen, wurden die Tiere unmittelbar vor den Versuchen mittels Kohlendioxid (CO_2) getötet.

2.2. Das Ischämie-Reperusions-Modell

Um eine transiente Ischämie im Modell zu imitieren, wurde zunächst das Versuchstier mittels Ketamin/Xylazin anästhesiert (100mg/kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid, Ratiopharm, Ulm, und 5mg/kg Körpergewicht Xylazin, Bayer Vital, Leverkusen, 100 mg/kg Körpergewicht Atropinsulfat; Braun, Melsungen). Anschließend wurde ausgehend von der Pars plana eine Kanüle/ Infusionsnadel (G27) in die vordere Augenkammer des behandelten Auges gelegt und mit einem Infusionsbeutel mit physiologischer Kochsalzlösung verbunden. Durch Anheben des Infusionsbeutels wurde der intraokuläre Druck für 90 Minuten auf 160mmHg

erhöht (=HIOP, high intra ocular pressure), infolgedessen ein Verschluss der retinalen Blutgefäße resultierte. Anschließend wurde die Kanüle entfernt und eine Reperfusion des Netzhautgewebes erlaubt. Das zweite Auge blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Sieben Tage nach dem Eingriff erfolgte die Entnahme der Augen für die anschließende Analyse.

2.3. Isolation des Auges und Präparation der Retina

Als erster Schritt erfolgte die Entnahme des Augapfels aus der Orbita des Versuchstieres. Nach Eukleation des Auges wurden zunächst bindegewebige Strukturen um das Auge entfernt, um es anschließend mittels eines kreisförmigen Schnittes entlang der Ora serrata (siehe Abbildung 4) zu eröffnen. Nach der Trennung der Kornea von Netzhaut und Sklera (in dem Zusammenhang wurde auch die Linse entfernt) erfolgte die Herauslösung des Glaskörpers aus dem verbliebenen Augenbecher. Im nächsten Schritt wurde nun die Retina mit einer speziellen Pinzette vom Pigmentepithel abgelöst und zur weiteren Bearbeitung auf einen Membranfilter in einer Petrischale mit Extrazellulärlösung aufgebracht. Auf diesem speziellen Filter wurde die Retina vorsichtig fixiert und präpariert, so dass die Photorezeptoren dem Membranfilter zugewandt lagen. Im Weiteren erfolgte für die Dauer von einer Stunde die Fixierung der Retina in Paraformaldehyd 4% in PBS, gefolgt von dreimaliger Waschung mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) und anschließender Lagerung in PBS über Nacht bei 4°C.

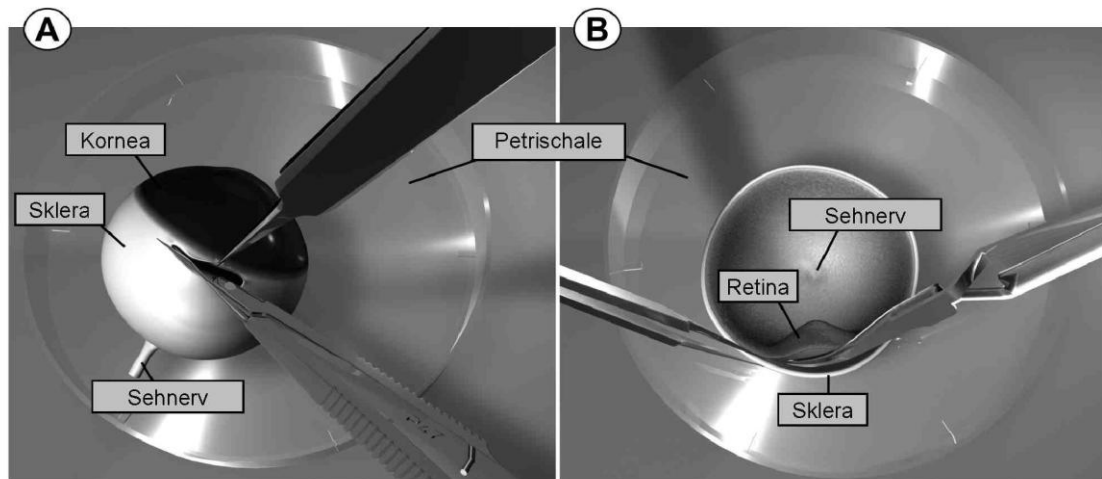


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Netzhautpräparation. (A) Kreisförmiger Schnitt entlang der Ora serrata, um die Kornea (Hornhaut) von Augenbecher mit dem Glaskörper zu trennen
(B) Nach Entfernung von Linse und Glaskörper wird die Netzhaut vorsichtig mittels einer speziellen Pinzette vom Pigmentepithel abgelöst.

2.4. Einbettung der Retina in Agarosegel

Zur Herstellung von Vibratomschnitten war es zunächst erforderlich die Netzhaut in einem 3%igen Agarosegel einzubetten. Hierzu wurden 25ml PBS und 0,75g Agarose aufgeköcht und nach Abkühlung auf 52°-55°C auf die in einer Petrischale (Ø 27mm) befindliche Netzhaut aufgebracht. Dabei war besonders darauf zu achten, dass die gesamte Netzhaut von Agarosegel umgeben ist. Nach Abkühlung und Aushärtung der Agarose im Kühlschrank, konnte die Netzhaut mit dem Agaroseblock aus der Petrischale entnommen werden.

2.5. Vibratomschnitte der Retina

Der Agaroseblock wurde anschließend so beschnitten, dass die Netzhaut im Agaroseblock in richtiger Orientierung bezüglich der Position des Schnittmessers des Vibratoms auf dem Objektträger mit Sekundenkleber fixiert werden konnte. Mit Hilfe des Vibratoms (Microm, Walldorf, Deutschland) wurden nun aus dem Agaroseblock Vibratomschnitte von 70 µm Dicke gefertigt. Diese wurden mit Hilfe

eines Pinsels aufgefangen und in einer Lösung aus PBS/Azid bis zur weiteren Bearbeitung (Immunhistochemie und Färbung) aufbewahrt.

2.6. Immunhistochemie und Färbemethoden

Zur Absättigung der unspezifischen Antikörperbindungsstellen wurden die Netzhautschnitte zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1%DMSO/0,3% Triton/ 5% Esel bzw. Ziegen-Serum in PBS behandelt. Im Anschluss erfolgte zeitgleich die Inkubation mit zwei verschiedenen Primärantikörpern in PBS/1%DMSO/0,3% Triton/5% Esel bzw. Ziegen-Serum über Nacht bei 4°C. Nichtgebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimalige Waschung mit PBS/1%BSA für je 15 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern in PBS/1%BSA für zwei Stunden bei Raumtemperatur, lichtgeschützt auf dem Schüttler. Nachfolgend wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen.

Die Färbung der Zellkerne mittels To-Pro-3-Iodid (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurde direkt im Anschluss an die Immunfärbung durchgeführt. Bei To-Pro-3-Iodid handelt es sich um ein Carbocyanin, das zum hochsensitiven Nachweis von DNA und somit zur Kernmarkierung dient. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Eppelheim, Deutschland) eingedeckt.

Eingesetzte Primärantikörper:

Maus- α -Glutaminsynthetase-Antikörper (1:400; Chemicon, Temecula, CA, USA)

Maus- α -GFAP-Antikörper (1:500, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Ziege- α -EGFP-Antikörper (1:200; Rockland, Gilbertsville, USA)

Kaninchen- α -CRALBP-Antikörper (1:200; Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland)

Eingesetzte Sekundärantikörper:

Cy2-gekoppelter Ziege- α -Maus-Antikörper (1:200; Dianova, Hamburg, Deutschland)

Cy3-gekoppelter Ziege- α -Kaninchen-Antikörper (1:200; Dianova)

Cy3-gekoppelter Esel- α -Maus-Antikörper (1:200; Dianova)

Cy2-gekoppelter Esel- α -Ziege-Antikörper (1:200; Dianova)

2.7. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)-Assay zur Detektion der Apoptoserate

Um zu untersuchen, ob es zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Absterben von retinalen Zellen in den verschiedenen Genotypen (Wildtyp, $P2Y_1^{-/-}$, $IP_3R2^{-/-}$) kommt, wurde ein Apoptose-Assay (*In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* - Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Unterlaufen Zellen den apoptotischen Zelltod, wird als einer der ersten Schritte ihre DNA fragmentiert. Diese DNA-Bruchstücke können durch eine enzymatische Reaktion, bei der fluoreszenzmarkierte Nukleotide an die freien DNA-Enden polymerisiert werden, nachgewiesen werden – diese Reaktion wird als „terminal transferase dUTP nick end labeling“ oder kurz TUNEL bezeichnet. Kerne apoptotischer Zellen können damit mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Für meine Experimente wurden die Netzhäute einen Tag nach Ischämie-Reperfusion präpariert und in 4% PFA in PBS für 60 Minuten fixiert. Wie für die Immunhistochemie beschrieben, wurden 70 μ m dicke Netzhautschnitte angefertigt. Für eine bessere Zugänglichkeit der DNA für die Agenzien des Assays, wurden die Schnitte kurz (ca. 30 Sekunden) in Citratpuffer (pH 6.0; 10 mM) aufgekocht. Anschließend erfolgte eine weitere Permeabilisierung der Schnitte mittels 4% Triton X-100 in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Vor Applikation des TUNEL-Labelling-Mixes (50 μ l Terminal-Transferase-Enzymlösung + 450 μ l Nukleotid-Mix, entsprechend der Herstellerangaben) wurden die Schnitte für 1 ½ Stunden bei Raumtemperatur in 0,1% Triton X-100/3% BSA in Tris-HCl, 0.1 M pH 7.5 inkubiert. Die TUNEL-Reaktion selbst erfolgte lichtgeschützt bei

37°C für 1 ½ Stunden. Abschließend wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte eine 10-minütige Inkubation in ToPro 3 (1:1000) in PBS um Gegenfärbung aller Kerne zu erzielen. Abschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und in Poly-Aqua/Mount (Polysciences Int.) eingedeckt.

2.8. Darstellung der Retina mittels Laser-Scanning-Mikroskop

Die fertigen Netzhautpräparate wurden mittels eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops LSM 510 Meta (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), einem 40x/W1,2 Apochromat Objektiv (Zeiss) und der zugehörigen Bildanalyse Software des Herstellers (LSM ImageBrowser Rel. 4.1, Zeiss) dargestellt. Das konfokale LSM besitzt eine zusätzliche Lochblende, durch die Fluoreszenzsignale, die außerhalb des Fokusbereiches liegen, zurückgehalten werden (d.h. es entstehen Aufnahmen mit einer definierten optischen Schnittdicke) und dadurch resultiert eine höhere räumliche Auflösung. Hierin liegt ein wesentlicher Vorteil der konfokalen Mikroskopie gegenüber der herkömmlichen Lichtmikroskopie begründet und eine qualitativ hochwertige Auswertung von immunhistologischen Präparaten wird ermöglicht.

Folgende Einstellungen für die Detektion der Fluoreszenz der einzelnen Farbstoffe wurden verwendet:

Cy2 – Anregungswellenlänge: 488 nm Emissionsfilter: Bandpass 405-430 nm

Cy3, TMR red – Anregungswellenlänge: 543 nm Emissionsfilter: Bandpass 485-630 nm

ToPro3 – Anregungswellenlänge: 633 nm Emissionsfilter: Langpass 650 nm

2.9. Quantifizierung der Zellzahl und statistische Analyse

Zur Quantifizierung der Zellzahlen wurde das Programm ImageJ (ImageJ Version 1.43u) genutzt. Hierzu wurde je Schnitt die Anzahl der Zellkerne in den verschiedenen Retinaschichten in einem 100µm breiten Netzhautabschnitt (optische Schnittdicke 1 µm) ausgezählt.

Die statistische Erfassung und Auswertung der erhobenen Daten wurde mit Hilfe der Programme Microsoft Office Excel und Graph Pad Prism (GraphPad Software, SanDiego, CA) durchgeführt. Zur Signifikanzprüfung wurde der Mann-Whitney Test (nicht parametrisch, zweiseitig) angewendet.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen inwieweit sich die fehlende Expression von Rezeptoren, welche essentiell für die Volumenregulation von Müllerzellen sind, unter hypoxisch-inflammatorischen Bedingungen auf die dabei stattfindende Neurodegeneration in den unterschiedlichen Netzhautschichten auswirkt. Zu diesem Zweck sollte die Neurodegeneration nach Ischämie in entsprechend genetisch veränderten Mauslinien (Überexpression von dnSNARE, P2Y₁-defizient, IP₃-R2-defizient) im Vergleich zu den passenden Wildtypkontrollen analysiert werden. In diesen Experimenten wurde das in der Arbeitsgruppe von Professor Reichenbach (Paul Flechsig Institut für Hirnforschung) bereits etablierte Ischämie-Reperfusionsmodell angewendet. Hierzu wurde der Augeninnendruck jeweils eines Auges des Versuchstiers über den Zeitraum von 90 Minuten über den systolischen Blutdruck angehoben und somit eine adäquate Durchblutung der Netzhaut unterbunden. Das andere Auge verblieb unbehandelt, so dass die ungeschädigte Netzhaut als Kontrolle betrachtet werden konnte. Sieben Tage nach dem Eingriff wurde aus beiden Augen die Netzhaut isoliert, immunhistochemisch aufbereitet und mikroskopisch dargestellt um letztlich eine Computer-gestützte Auswertung vorzunehmen (Abb. 5). Aus früheren Studien ist bekannt, dass die einzelnen Zelltypen (z.B. Ganglienzellen, Bipolarzellen, Photorezeptoren) in der Netzhaut unterschiedlich empfindlich auf hypoxisch/ischämische Bedingungen reagieren (Neroev et al. 2010). Um eine grobe Abschätzung der Auswirkung der experimentellen Ischämie auf das Überleben der einzelnen Zellklassen zu erlangen, wurden die Zellzahlen in den einzelnen Körnerschichten im Kontroll- bzw. im ischämischen Auge bestimmt und verglichen.

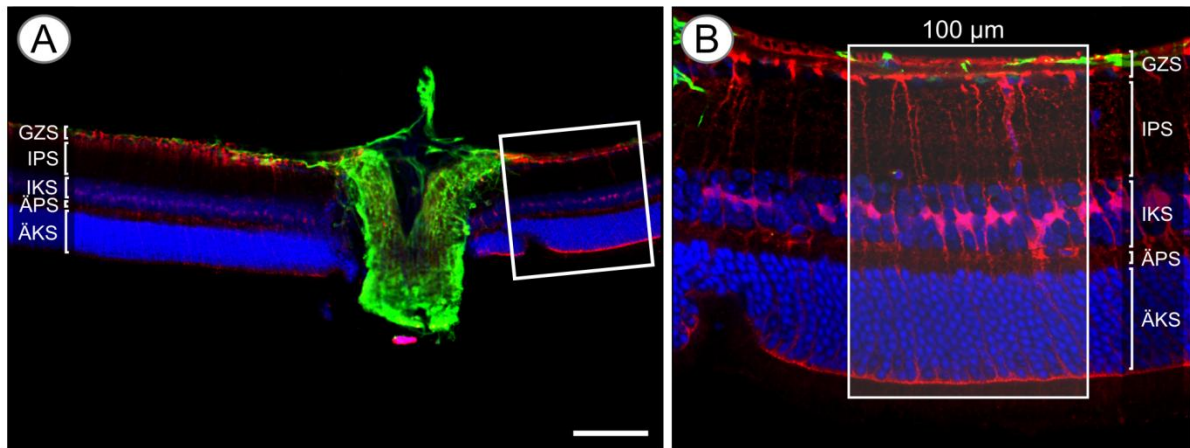


Abbildung 5 Repräsentativer immunhistologisch aufgearbeiteter Schnitt zur Visualisierung der Zellkerne in den verschiedenen Schichten der Netzhaut. (A) Übersicht über die zentrale Netzhaut in einem unbehandelten Kontrollauge eines Wildtyp-tieres. Die nukleären Schichten werden durch den Kernfarbstoff ToPro dargestellt (blau). In der gesunden Netzhaut exprimieren nur Astrozyten in der Nervenfaserschicht und im Sehnervkopf (Pfeil) das glial fibrillary acidic protein (GFAP, grün). Das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (CRALBP, rot) dient als spezifischer Marker für Müllerzellen. (B) Inset aus (A) in höherer Auflösung dargestellt. Deutlich sind die retinalen Schichten und die die gesamte Netzhaut durchspannenden Müllerzellen (rot) erkennbar. Die im weiteren Verlauf meiner Doktorarbeit beschriebene Quantifizierung der Zellzahlen in den einzelnen Netzhautschichten erfolgte je Schnitt in einem 100 µm breiten Netzhautabschnitt. GZS, Ganglienzellschicht; IPS, innere plexiforme Schicht; IKS, innere nukleäre Schicht; ÄPS, äußere plexiforme Schicht; ÄKS, äußere nukleäre Schicht. Größenstandard, 100 µm.

3.1. Untersuchungen an Augen von Tieren mit monogener Expression des tTA- bzw. TSL-Transgens

Wie bereits einleitend erwähnt, sind dnSNARE-Mäuse transgene Tiere, die durch zwei Eingriffe im Genom geschaffen worden. Dabei wurde zum einen eine exogene SNARE-Domäne (dominant-negativ, TSL) exprimiert, die die vesikuläre Freisetzung von Transmittern unterdrückt/ beeinträchtigt (Pascual et al., 2005, siehe Einleitung Kapitel 1.6.1.) Das zweite Transgen (tTA) ermöglicht eine zeitlich regulierbare und Gliazell-spezifische Expression des dnSNARE-Transgens.

Um auszuschließen, dass die Veränderungen im Genom der dnSNARE-Maus allein einen Einfluss auf die Netzhautmorphologie haben, wurden zu Beginn der Arbeit Kontrollaugen mit jeweils monogener Expression des tTA- oder TSL-Transgens untersucht und mit dem Wildtyp-Mausstamm verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 6A und 6B dargestellt.

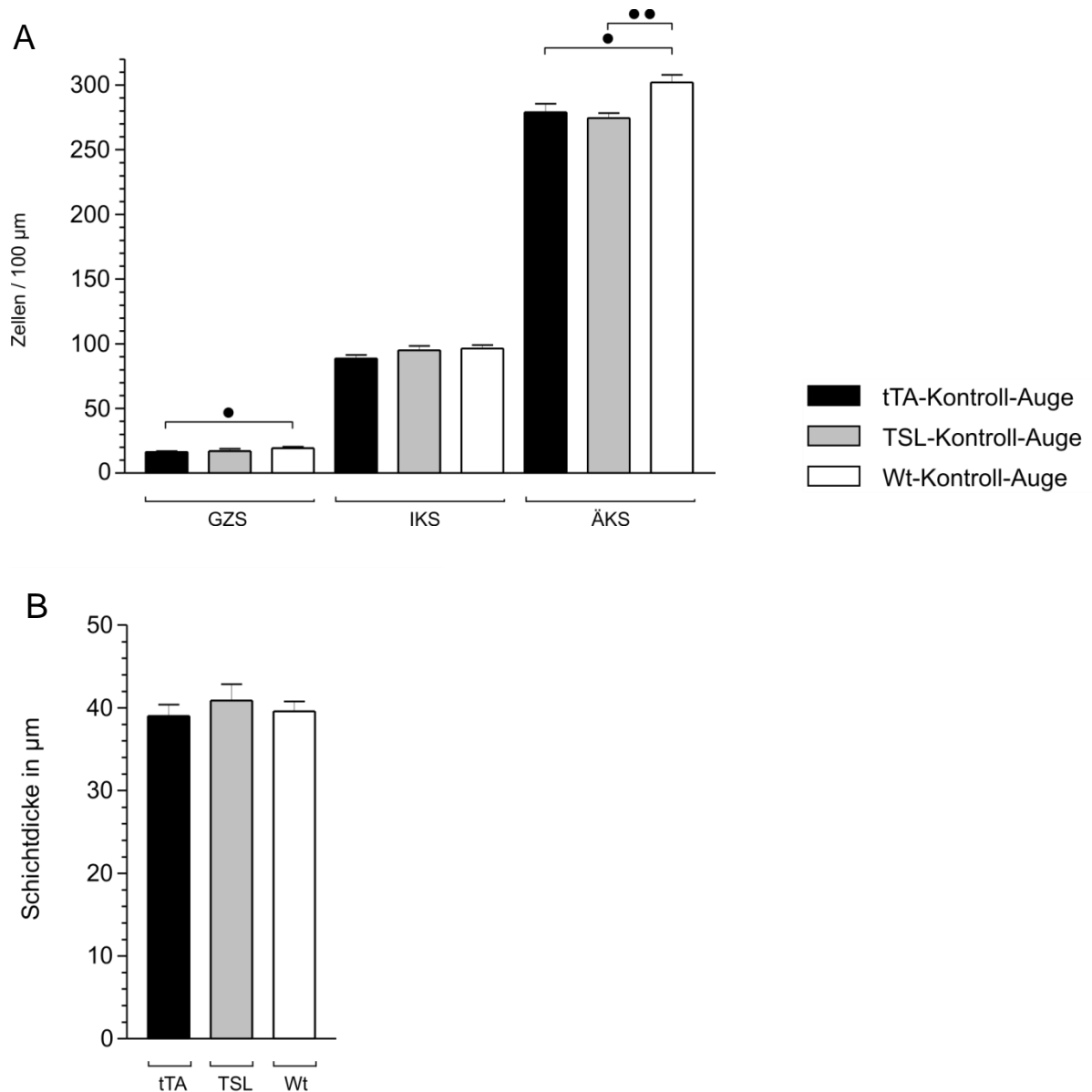


Abbildung 6 (A) Darstellung der Zellzahl in Ganglienzellschicht (GZS), innerer (IKS) und äußerer (ÄKS) Körnerzellschicht und (B) Vergleich der Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht im tTA-, TSL- und Wt-Kontrollauge.

Wie in Abbildung 6A zu erkennen, konnten sowohl in der Ganglienzellschicht als auch in der äußeren Körnerzellschicht geringe Differenzen der Zellzahl zwischen den untersuchten Kontrollaugen erfasst werden. Die Zahl der Nervenzellen war in Kontrollaugen von monogenen transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant verringert. Hingegen waren in der inneren Körnerzellschicht und der inneren plexiformen Schicht keine markanten Unterschiede der Zellzahl und Schichtdicke der unbehandelten Retina festzustellen.

Die genetischen Veränderungen in den jeweils monogenen transgenen Mauslinien (TSL, tTA) haben nur einen geringen, wenn auch signifikanten Einfluss auf die Quantität der Zellen von GZS und ÄKS, während keine Unterschiede in der Zellzahl der IKS sowie der Dicke der inneren plexiformen Schicht beobachtet werden konnten. Entsprechend sind wir in den folgenden Experimenten zur Analyse von doppeltransgenen dnSNARE-Mäusen im Vergleich mit Wildtypkontrollen übergegangen.

3.2. Effekt der Überexpression von dominant negativem SNARE-Protein in dnSNARE-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen

Die Daten wurden durch die Untersuchung von 7 dnSNARE-Mäusen und 5 Wildtyp-Mäusen erhoben und repräsentieren Mittelwerte \pm SEM. Das typische Aussehen der Netzhaut von Wildtyp- und dnSNARE-Mäusen unter Kontroll- und postischämischen Bedingungen wird in Abb. 7 gezeigt.

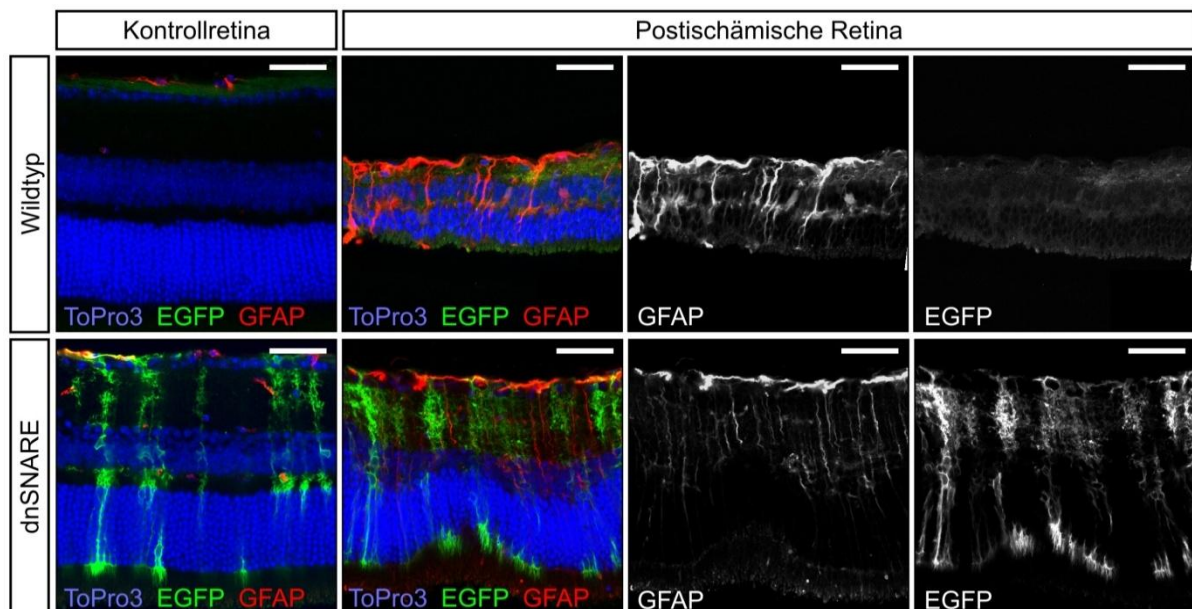


Abbildung 7 Exemplarische Schnitte von Kontroll- und postischämischen Netzhäuten aus Wildtyp- und dnSNARE-Mäusen. Die nukleären Schichten wurden durch Verwendung des Kernfarbstoffes ToPro dargestellt. Während GFAP in Kontrollnetzhäuten in beiden Mauslinien ausschließlich in Astrozyten exprimiert wird, ist es in den ischämischen Netzhäuten auch in Müllerzellen nachweisbar. Das Markerprotein für die Transgenexpression, das grün fluoreszierende Protein EGFP, ist ausschließlich in Müllerzellen von dnSNARE-Mäusen detektierbar. Im Wildtyp ist lediglich unspezifische Autofluoreszenz detektierbar. Größenstandard, 50 μ m.

3.2.1. Die Ganglienzellschicht (GZS)

Entsprechend den Studien von Neufeld et al. (2002) und Selles-Navarro et al. (1996) gehören Ganglienzellen zu der Zellpopulation in der Netzhaut, die am empfindlichsten auf die mit der Ischämie assoziierte neuronale Übererregung reagiert und frühzeitig degeneriert. In der Tat konnte ich einen signifikanten Verlust von Zellen in der Ganglienzellschicht sowohl von dnSNARE-Tieren als auch von Wildtyp-Tieren nachweisen (s. Abb. 8). Des weiteren wurde geprüft, ob die Zelldichte in dnSNARE-Tieren im unbehandelten Kontrollauge von der in Wildtyp-Tieren abwich. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass unter normalen physiologischen Bedingungen die durch die dnSNARE-Expression bedingte Funktionseinschränkung von Müllerzellen zu keinem messbaren Zellverlust in der Ganglienzellschicht führt. Allerdings zeigte sich, dass die Degeneration in der GZS von ischämischen Retinae aus dnSNARE-Mäusen im Vergleich mit entsprechend behandelten Wildtyp-Tieren weniger stark ausgeprägt ist (signifikant $P < 0,05$, siehe Abb. 8).

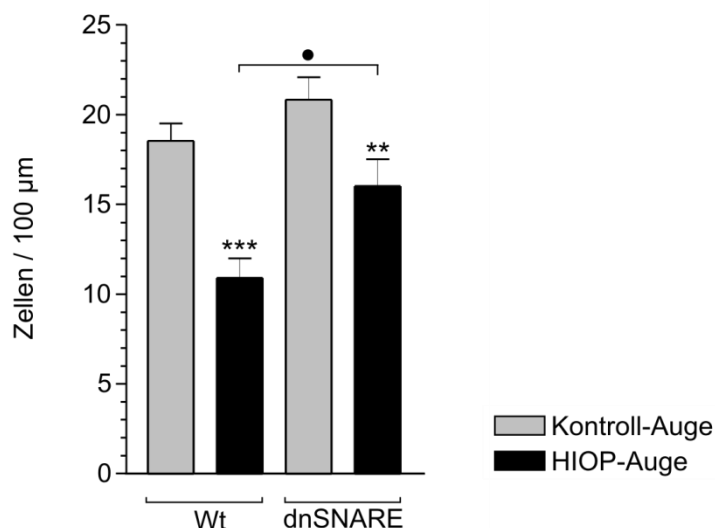


Abbildung 8 Quantitative Darstellung der Zellzahl der Ganglienzellschicht im Vergleich von dnSNARE-Mäusen (dnSNARE) mit Wildtyp-Mäusen (Wt). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. • $P < 0,05$: versus Vergleichsschicht der Wildtyp-Maus. HIOP, high intra ocular pressure.

3.2.2. Die innere Körnerzellschicht (IKS)

Im Folgenden wurde die innere Körnerzellschicht, die sich aus den Zellkörpern von Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen sowie denen der Müller-Zellen zusammen setzt (Sachsenweger et al., 2003), ausgezählt. In den von mir untersuchten Kontrollaugen der dnSNARE- und der Wildtyp-Tiere konnte in einem 100µm großen Retinaausschnitt ein Mittelwert von 95 und 94 Zellen ermittelt werden (Abb. 9). Die Zelldichte der IKS war also in beiden Mausstämmen etwa gleich, was darauf schließen lässt, dass eine möglicherweise durch die dnSNARE-Expression hervorgerufene Funktionseinschränkung der Müllerzellen unter physiologischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Zelldichte der IKS hat. Die Untersuchung der postischämischen Retinae zeigte hingegen einen signifikanten Zellverlust auf Mittelwerte von 73 ± 5 Zellen (dnSNARE) und 51 ± 4 Zellen (Wt) (Abb. 9). Auch hier zeigte sich, dass die Degeneration der Zellen der IKS—wie bereits in der GZS beobachtet— bei den dnSNARE-Mäusen signifikant geringer ausgeprägt war als beim gleichbehandelten Wildtyp-Tier.

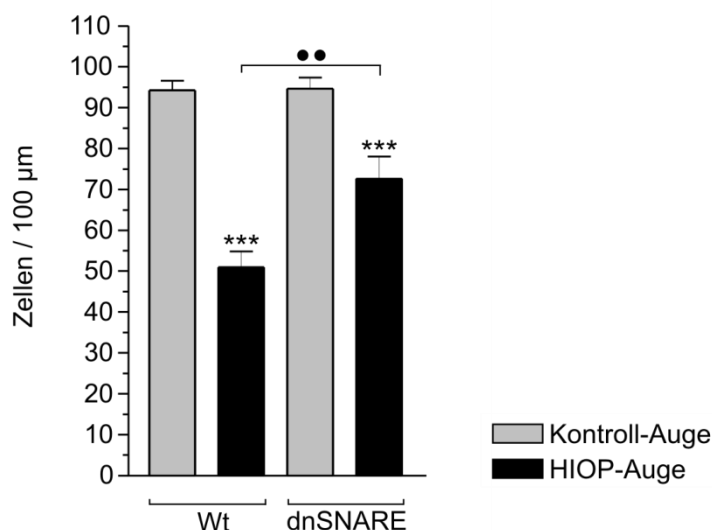


Abbildung 9 Quantitative Darstellung der Zellzahl der inneren Körnerzellschicht (IKS) im Vergleich von dnSNARE-Mäusen (dnSNARE) mit Wildtyp-Mäusen (Wt). *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. •• $P < 0,01$: versus Vergleichsschicht der Wildtyp-Maus.

3.2.3. Die äußere Körnerzellschicht (ÄKS)

Die Zellkerne der Photorezeptoren, der Stäbchen und Zapfen, bilden die äußere Körnerzellschicht (Sachsenweger et al., 2003). In einem 100µm Abschnitt der Retina konnten in beiden hier untersuchten Mausstämmen durchschnittlich etwa 290 Zellen ausgezählt werden (s. Abb. 10). Es zeigte sich wiederum kein Einfluss der dnSNARE-Expression auf die Zelldichte im unbehandelten Auge, wie schon in der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerzellschicht beobachtet. In den postischämischen Retinae der dnSNARE-Mäusen wurde eine auf 45% und bei den Wildtyp-Mäusen sogar auf 18% signifikant reduzierte Zellzahl der ÄKS registriert. Erneut zeigte sich, dass der Zellverlust bei den dnSNARE-Tieren weniger stark ausgeprägt war als bei entsprechend behandelten Wildtyp-Tieren.

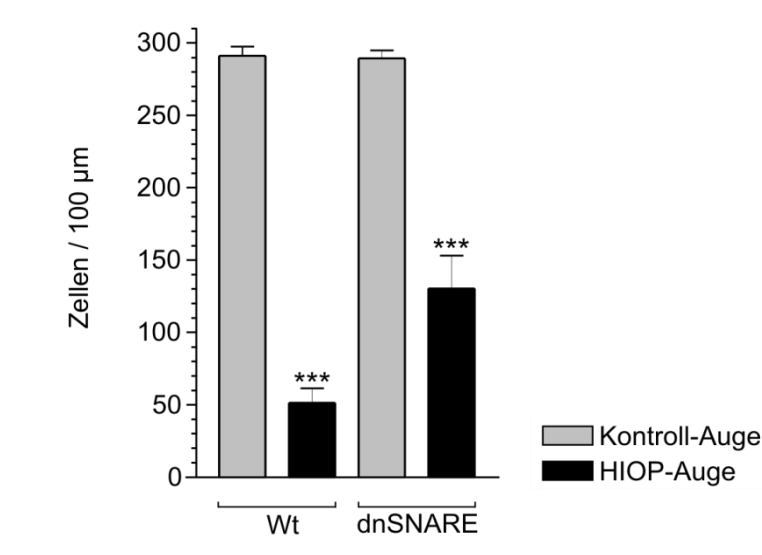


Abbildung 10 Quantitative Darstellung der Zellzahl der äußeren Körnerzellschicht von dnSNARE-Mäusen (dnSNARE) und Wildtyp-Mäusen (Wt). *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges.

3.2.4. Die innere plexiforme Schicht (IPS)

Die innere plexiforme Schicht der Retina wird aus den Dendriten der Ganglien- und amakrinen Zellen und den Axonen der Bipolarzellen gebildet, welche hier in synaptische Interaktion treten. Zudem werden die Synapsen von perisynaptischen Fortsätzen der Müllerzellen, die von deren innerem Stammfortsatz ausgehend die IPS durchziehen, umschieden (Reichenbach, 1999). In beiden hier untersuchten

Mausstämmen beträgt die Schichtdicke der IPS des unbehandelten Auges im Mittelwert $42 \pm 2 \mu\text{m}$ (Wt) und $43 \pm 1 \mu\text{m}$ (dnSNARE) (Abb. 11). Im genetisch veränderten Tier (dnSNARE-Maus) zeigte sich postischämisch eine signifikante Verminderung der Schichtdicke auf 78%, im Wildtyp-Tier sogar auf 33%. Die Abnahme der Schichtdicke ist beim Wildtyp noch deutlich stärker ausgeprägt als bei den dnSNARE-Tieren (signifikant mit $P < 0,01$, Abb. 11). In den dnSNARE-Mäusen resultiert sowohl ein geringerer Zellverlust als auch eine geringere Schädigung der IPS (=Abnahme der Schichtdicke) im Vergleich zum Wildtyp-Tier.

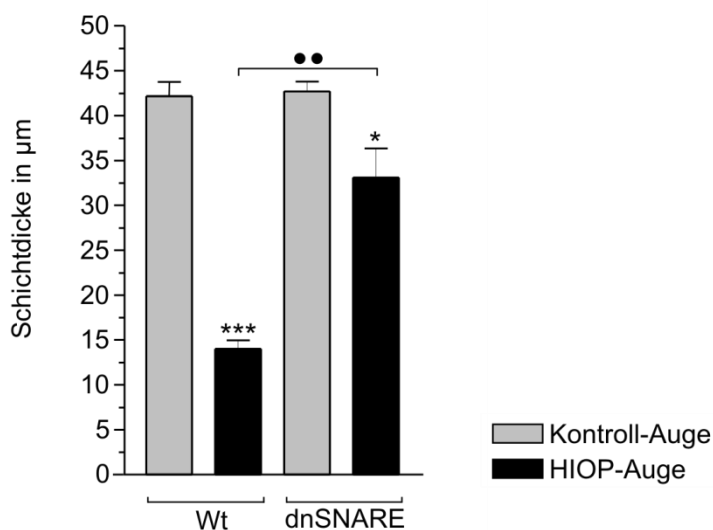


Abbildung 11 Vergleich der Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht (IPS) von dnSNARE-Mäusen (dnSNARE) und Wildtyp-Mäusen (Wt). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. •• $P < 0,01$: versus Vergleichsschicht der Wildtyp-Maus.

3.2.5. Veränderung der Zellzahl nach Ischämie

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es in allen untersuchten Retinaschichten (GZS, IKS, ÄKS) nach einer transienten Ischämie zu einem Zellverlust bzw. zu einer Abnahme der Schichtdicke der IPS kommt (siehe Tabelle1). Es zeigt sich außerdem, dass die Neurodegeneration in der genetisch veränderten Mauslinie (dnSNARE-Maus) geringer ausfällt als beim altersentsprechenden, gleichbehandelten Wildtyp-Tier. Signifikante Unterschiede zwischen dnSNARE und Wildtyp-Maus konnten in der Ganglienzellschicht, der inneren Körnerzellschicht und der inneren plexiformen Schicht nachgewiesen werden.

Tabelle 1 *Prozentuale Veränderung der Zellzahl (GZS, IKS, ÄKS) und der Schichtdicke (IPS) nach Ischämie im Vergleich zum unbehandelten Kontroll-Auge.*

% (HIOP/Kontrolle)	GZS (Zellzahl)	IKS (Zellzahl)	ÄKS (Zellzahl)	IPS (Schichtdicke)
Wildtyp-Mausstamm	58,8	54,1	17,7	33,2
dnSNARE-Mausstamm	76,9	76,8	45,1	77,6

3.3. Effekt des Defizits des P2Y₁-Rezeptors im Ischämie/

Reperusionsmodell im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Auswertung von Retinaschnitten von P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäusen und altersentsprechenden Wildtyp-Mäusen dargestellt. Es wurden 5 Tiere mit P2Y₁-Rezeptor-Defizit und 4 Wildtyp-Mäuse, welche eine normale P2Y₁-Rezeptor-Expression aufwiesen, verglichen. Alle Angaben repräsentieren Mittelwerte ± SEM.

Erwartungsgemäß trat auch bei diesen Tieren nach definierter Ischämie ein messbarer Zellverlust in den verschiedenen Netzhautschichten auf. Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Retinaschichten dargestellt.

3.3.1. Die Ganglienzellschicht (GZS)

Bei der Untersuchung der Ganglienzellschicht dieser beiden Mauslinien konnte ich bereits am unbehandelten Kontrollauge quantitative Unterschiede der Zellzahlen feststellen. Die Anzahl von Zellen in der GZS der P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäuse war hierbei signifikant geringer als die der vergleichbaren Wildtypen (Abb. 12).

Nach Ablauf der definierten Ischämie und siebentägiger Überlebenszeit war bei beiden Mauslinien eine Abnahme der Zellzahl auf circa die Hälfte der Zellen im vergleichbaren Kontrollauge als Zeichen der Degeneration zu registrieren. Hinsichtlich der absoluten Zahlenwerte ist die Zahl der überlebenden Zellen nach Ischämie in der GZS der P2Y₁^{-/-}-Tiere geringer (Abb. 12). Ursache dafür ist allerdings die bereits verringerte Zellzahl im unbehandelten Kontrollauge. Der

prozentuale Zellverlust ist bei beiden Stämmen nicht signifikant unterschiedlich (Wildtyp: $50,6 \pm 0,7\%$; $P2Y_1^{-/-}$: $51,6 \pm 0,7\%$).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Defizit des $P2Y_1$ -Rezeptors unter hypoxischen Bedingungen zu keiner stärkeren Degeneration der Netzhautzellen in der GZS (schließlich besteht der Unterschied in der Anzahl existierender Zellen in der GZS bereits vor der ischämischen Schädigung der Netzhaut) führt.

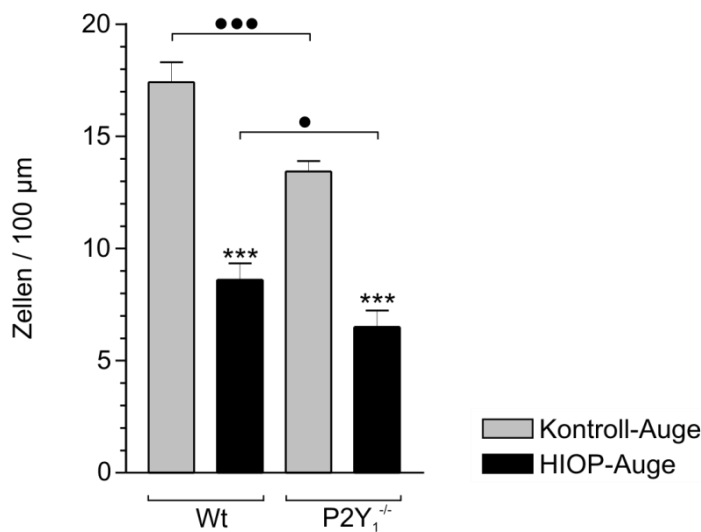


Abbildung 12 Quantitative Darstellung der Zellzahl in der Ganglienzellschicht (GZS) im Vergleich von $P2Y_1$ -defizienten-Mäusen ($P2Y_1^{-/-}$) und Wildtyp-Mäusen (Wt). *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. • $P < 0,05$, ••• $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht der Wildtyp-Maus.

3.3.2. Die innere Körnerzellschicht (IKS)

Vorweg wurde erneut der Einfluss der genetischen Manipulation auf die gesunde Retina geprüft. Hier zeigte sich -wie schon in der GZS auffällig-, dass die Zelldichte der IKS im unbehandelten Auge bereits signifikant verschieden ist. Bei der $P2Y_1$ -defizienten Maus ist die Zahl der erfassten Zellen (Müllerzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen, Horizontalzellen) mit einem MW von 88 ± 4 auffällig niedriger als beim vergleichbaren Wildtypstier mit 101 ± 3 . Im postischämischen Auge konnten sowohl beim Wildtyp-Mausstamm mit $35,1 \pm 2,2\%$, als auch beim $P2Y_1$ -defizienten Mausstamm mit $33,4 \pm 4,4\%$ relativ hohe, jedoch geringere

Zellverluste als in der GZS, nachgewiesen werden. Der Vergleich der Zellzahlen aus ischämischen Augen von Wildtyp- und P2Y₁-defizienten Tieren ergab keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 13).

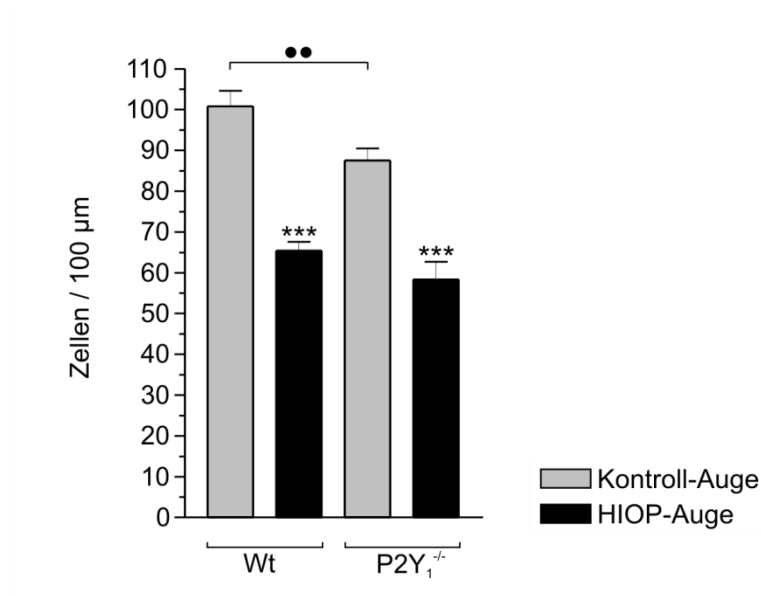


Abbildung 13 Quantitative Darstellung der Zellzahl der inneren Körnerzellschicht im Vergleich von P2Y₁-Knockout-Mäusen (P2Y₁^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (Wt). *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. •• $P < 0,01$: versus Vergleichsschicht der Wildtyp-Maus.

3.3.3. Die äußere Körnerzellschicht (ÄKS)

Um den Einfluss der genetischen Manipulation (Defizit des P2Y₁-Rezeptors) auf die Morphologie der äußeren Körnerzellschicht zu prüfen, wurde wiederum zuerst die Zellzahl der Photorezeptoren im Kontrollauge beider Tierstämme verglichen. Hier konnte kein relevanter Unterschied festgestellt werden.

Im Weiteren wurde untersucht, ob das Defizit des P2Y₁-Rezeptors einen Einfluss auf das Ausmaß der Neurodegeneration nach Ischämie hat. In behandelten Augen beider Mausstämme fand sich wiederum ein signifikanter Zellverlust gegenüber dem unbehandelten Auge als Zeichen der hypoxischen Schädigung, wobei der Zellverlust beim P2Y₁-defizienten Mausstamm mit $55,9 \pm 14,0$ % deutlich stärker ausfiel, als beim gleichbehandelten Wildtyp-Stamm mit $37,2 \pm 14,0$ %. Der Unterschied zwischen beiden hypoxisch veränderten Augen war signifikant (siehe

Abb.14). Das Fehlen des P2Y₁-Rezeptors und die damit einhergehende Funktionseinschränkung der Müllerzellen (Beeinträchtigung der glutamaterg-purinergen Signalkaskade) hat einen negativen Einfluss auf das Ausmaß der Zellschädigung nach Ischämie. Dies bestätigt daher die bisherigen Angaben in der Literatur (Wurm et al. 2009; 2010), dass der P2Y₁-Rezeptor in seiner Vermittlung der glutamaterg-purinergen Signalkaskade von essentieller Bedeutung für die Volumenregulation der Müllerzelle und damit für die Volumenhomöostase der Retina ist.

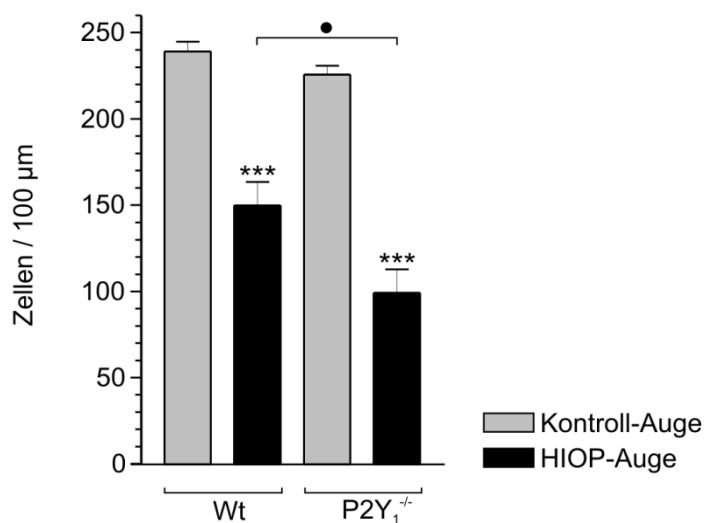


Abbildung 14 Quantitative Darstellung der Zellen der äußeren Körnerzellschicht im Vergleich von P2Y₁-Knockout-Mäusen (P2Y₁^{-/-}) und Wildtyp-Mäusen (Wt). *** P < 0,001: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. • P < 0,05: versus Vergleichsschicht der Wildtyp-Maus.

3.3.4. Die innere plexiforme Schicht (IPS)

Auch hier erfolgte im Rahmen der Untersuchung der beiden Mauslinien eine Bestimmung der Schichtdicke der IPS, der Schicht der synaptischen Verschaltungen zwischen zweitem und drittem Neuron der Sehbahn. Diese Ausmessung ergab im unbehandelten Auge der P2Y₁^{-/-}-Maus mit einem Mittelwert von 44,3±1,0 µm geringere Schichtdicken als beim unbehandelten Wildtyp-Auge mit einem Mittelwert von 46,1±0,6 µm (nicht signifikant, Abb. 15). Postischämisch war bei beiden untersuchten Mausstämmen eine deutliche Abnahme der Schichtdicke zu verzeichnen. Bei den Wildtyp-Mäusen war die IPS auf 36%

reduziert, während sie bei den P2Y₁-Rezeptor-defizienten Mäusen nur auf 51% vermindert war (Abb. 15). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mauslinien festgestellt werden.

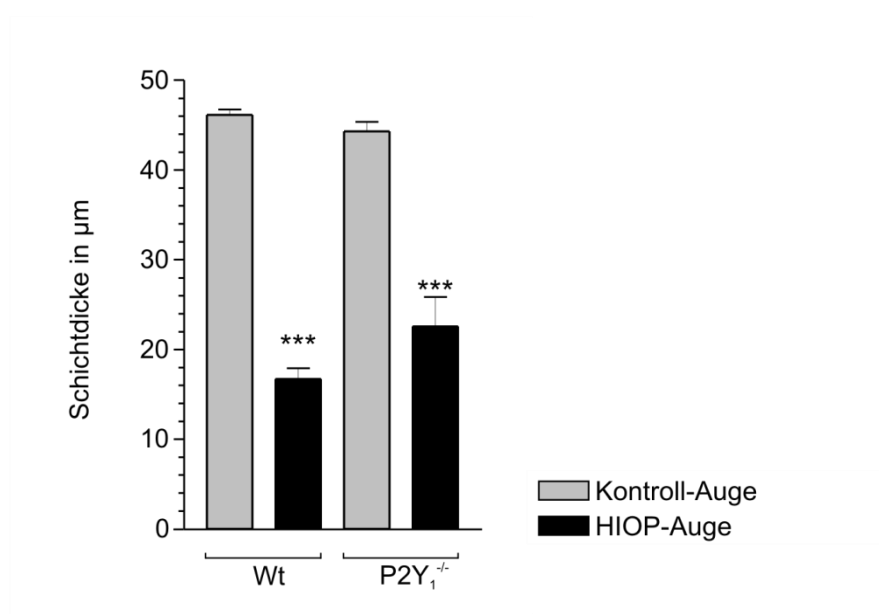


Abbildung 15 Vergleich der Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht (IPS) von P2Y₁-Knockout-Mäusen (P2Y₁^{-/-}) und Wildtyp Mäusen (Wt). *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges.

3.4. Effekt der Abwesenheit des IP₃-Rezeptor Typ2 (IP₃R2^{-/-}) auf die Degeneration retinaler Zellen nach Ischämie/Reperfusion der Netzhaut

Die folgenden Daten wurden durch die Analyse der Netzhautschnitte von IP₃R2-defizienten Mäusen im Vergleich mit altersentsprechenden Wildtyp-Mäusen gewonnen. Der IP₃-Rezeptor Typ2 vermittelt die Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum in Müllerzellen nach Aktivierung des P2Y₁-Rezeptors (Lipp et al., 2009; Wurm et al., 2010). Die Daten wurden durch Untersuchungen von 4 Tieren je Mauslinie erhoben und repräsentieren Mittelwerte ± SEM. Sowohl in den IP₃R2-defizienten Mäusen als auch in den Wildtyp-Tieren konnte postischämisch ein hochsignifikanter Zellverlust als Zeichen der Neurodegeneration nachgewiesen werden. Im Einzelnen sind die Ergebnisse nachfolgend dargestellt.

3.4.1. Die Ganglienzellschicht (GZS)

Die Analyse der Ganglienzellschicht dieser beiden Mauslinien konnte die hohe Empfindlichkeit der Nervenzellen der GZS auf hypoxisch-ischämische Verhältnisse (Neufeld et al., 2002; Selles-Navarro et al., 1996) bestätigen. Zuerst wurden erneut die unbehandelten Kontrollaugen beider Mausstämme verglichen, ohne dass ein signifikanter Unterschied der Quantität der Ganglienzellen beobachtet werden konnte. Nach einer definierten transienten Ischämie (HIOP = high intra-occular pressure) ließ sich bei beiden Mausstämmen eine signifikant reduzierte Zellzahl der innersten Zellschicht der Retina feststellen (siehe Abb. 16). Im Vergleich der postischämischen Netzhäute von Wildtypmäusen und IP_3R2 -defizienten Mäusen zeigten sich auch keine signifikanten Unterschiede, was darauf schließen lässt, dass das Fehlen des IP_3R2 keinen Einfluß auf das Absterben von Zellen in der Ganglienzellschicht nach Ischämie hat.

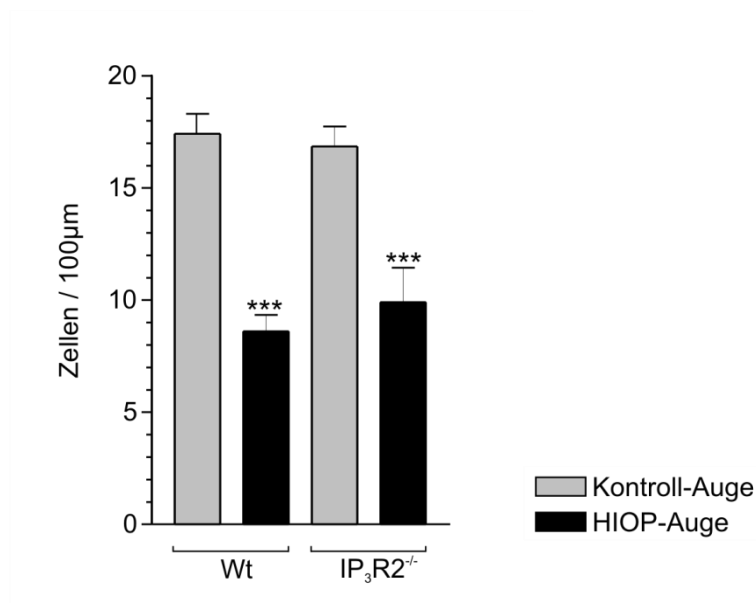


Abbildung 16 Quantitative Darstellung der Zellzahl der Ganglienzellschicht im Vergleich von IP_3R2 -Knockout-Mäusen ($IP_3R2^{-/-}$) und Wildtyp-Mäusen (Wt). *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges.

3.4.2. Die innere Körnerzellschicht (IKS)

Die Neuronen der IKS haben im unbehandelten Auge beider hier untersuchter Mausstämme eine Zelldichte von circa 100 Zellen je 100µm großem Netzhautabschnitt. Daher kann man davon ausgehen, dass das Defizit des IP₃Rezeptors Typ 2 allein keinen Einfluss auf die Zellzahl der inneren Körnerzellschicht hat. Nach transientscher Ischämie konnte sowohl beim Wildtyp-Tier als auch beim IP₃R2-defizienten Tier ein signifikanter Zellverlust als Zeichen der Degeneration ermittelt werden. Der Vergleich der Retinae nach Ischämie ergab signifikante Unterschiede in der Zellzahl, sodass möglicherweise bei Fehlen des IP₃R2 eine stärkere Zellschädigung unter ischämischen Bedingungen resultiert (Abb. 17).

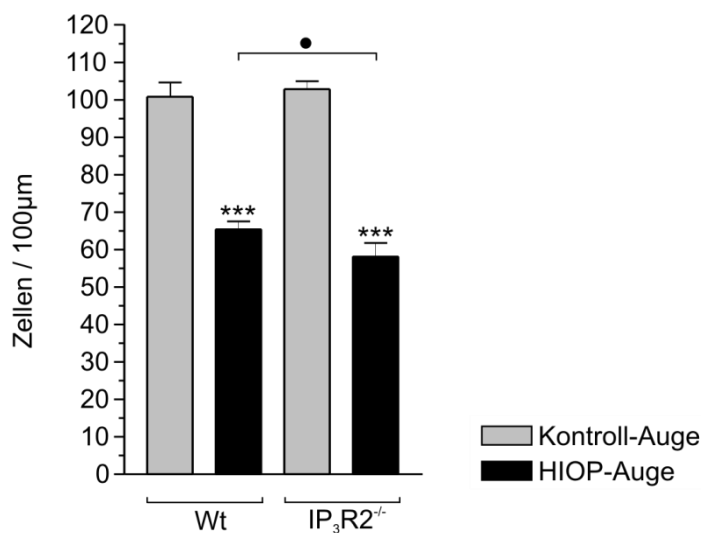


Abbildung 17 Zellzahl der inneren Körnerzellschicht (IKS) im Vergleich von IP₃R2-defizienten-Mäusen (IP₃R2) und Wildtyp-Mäusen (Wt). *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. • $P < 0,05$: versus Vergleichsschicht der Wildtyp-Maus.

3.4.3. Die äußere Körnerzellschicht (ÄKS)

Die ÄKS mit den Zellkörpern der Photorezeptoren bildet die äußerste und die zellreichste Schicht der Mausretina. Bei beiden untersuchten Mausstämmen konnten hier im unbehandelten Auge durchschnittlich etwa 240 Zellen/100µm Retinaabschnitt erfasst werden (s. Abb. 18). Das Defizit des IP₃-Rezeptors Typ2

hat also auch in dieser Retinaschicht keinen Einfluss auf die Quantität der Zellen der ÄKS der unbehandelten Netzhaut. Nach der temporären Ischämie war die Zellzahl beim Wildtyp-Tier auf durchschnittlich 150 Zellen und bei IP_3R2 -defizienten Mäusen sogar auf bis zu 95 Zellen vermindert (s. Abb. 18). Damit konnte wie bereits in der IKS auch hier ein signifikanter Unterschied zwischen den postischämischen Augen beider Mausstämme ermittelt werden. Aus dem stärkeren Verlust von Nervenzellen in der ÄKS IP_3R2 -defizienter Tiere schließe ich, dass der IP_3 -Rezeptor Typ2 in seiner Vermittlung des Ca^{2+} -Anstieges in den Gliazellen und daraus resultierenden zellulären Funktionsänderungen einen wesentlichen Einfluss auf die Photorezeptordegeneration nach Ischämie hat.

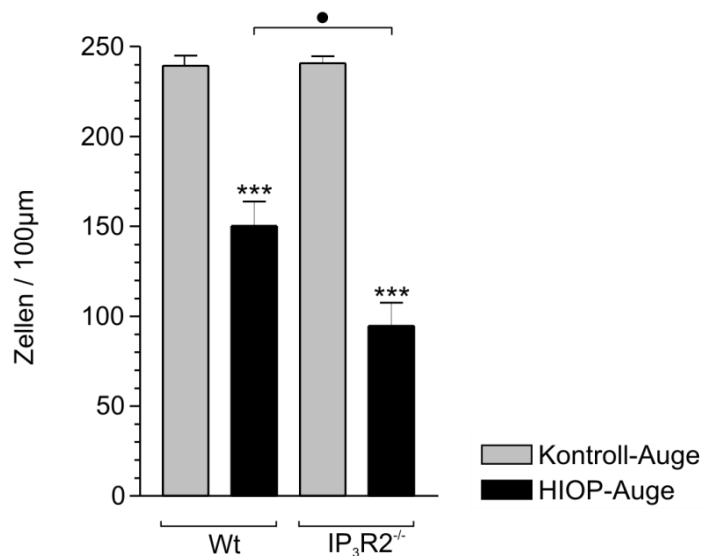


Abbildung 18 Zellzahl der äußeren Körnerzellschicht (ÄKS) im Vergleich von IP_3R2 -defizienten-Mäusen (IP_3R2) und Wildtyp-Mäusen (Wt). *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. • $P < 0,05$: versus Vergleichsschicht der Wildtyp-Maus.

3.4.4. Die innere plexiforme Schicht (IPS)

Die Ausmessung der IPS der unbehandelten Kontrollaugen ergab bei beiden Tierstämmen annähernd gleiche Schichtdicken mit Mittelwerten von $45,5 \pm 1,3 \mu m$ ($IP_3R2^{-/-}$) und $46,1 \pm 0,6 \mu m$ (Wt) (Abb. 19). Die Bestimmung der Schichtdicke der postischämischen Augen ergab Werte von $18,2 \pm 1,6 \mu m$ ($IP_3R2^{-/-}$) und $16,7 \pm 1,2 \mu m$ (Wt), woraus eine prozentuale Abnahme der Schichtdicke von etwa 60 bis 64%

resultiert (Abb. 19). Damit zeigt sich kein nennenswerter Unterschied der Dicke der inneren plexiformen Schicht. Das Fehlen des IP₃R2 hat also keinen Einfluss auf den Erhalt bzw. die Degeneration neuronaler Strukturen in der ischämiegeschädigten IPS.

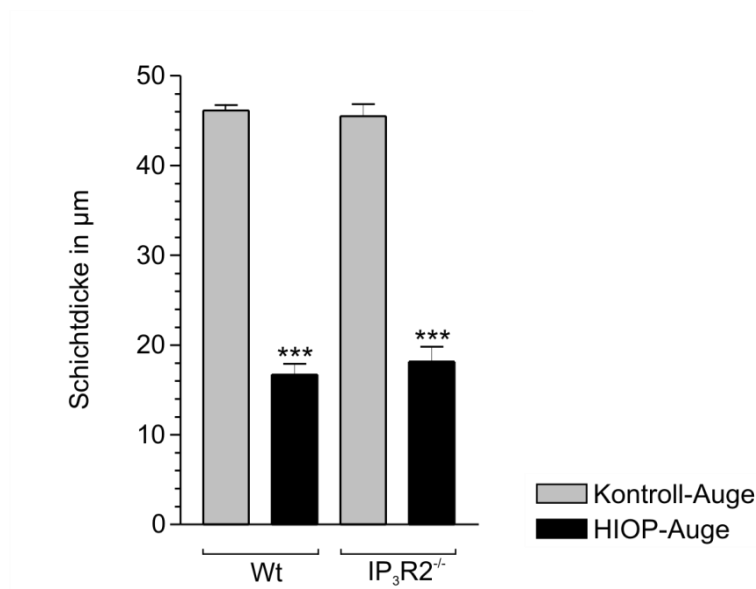


Abbildung 19 Vergleich der Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht (IPS) von IP₃R2-defizienten-Mäusen (IP₃R2^{-/-}) und Wildtyp Mäusen (Wt). *** $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges.

3.5. Vergleich von IP₃-Rezeptor Typ2-defizienten- und P2Y₁-defizienten-Mäusen

Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 1.6.2 und 1.6.3), zählen IP₃R2- (intrazelluläre ligandengesteuerte Kalziumkanäle) und P2Y₁-(G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) Rezeptoren zur Gruppe der membrangebundenen Rezeptoren, die über die Steuerung verschiedener Ionenströme der Zellen eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen einnehmen. Nach Stimulierung des P2Y₁-Rezeptors mittels ADP werden über die Aktivierung der Phospholipase C_β die „second messenger“ Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) gebildet, welche die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, z.B. über Aktivierung des IP₃R2, bewirken (Hofman et al. 2001). Das Fehlen eines der beiden Rezeptoren in der glutamaterg-purinergen Signalkaskade von Müllerzellen hat meinen bisherigen Ergebnissen nach zur Folge, dass ein deutlich ausgeprägter Zellverlust unter

ischämisch-hypoxischen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyptier auftritt. So führt das jeweilige Rezeptordefizit beispielsweise in der äußeren Körnerzellschicht zu einer stärkeren Degeneration der Photorezeptorzellen nach Ischämie als beim gleichbehandelten Wildtypmausstamm (siehe Abbildung 14 und 18).

In den einzelnen Schichten der Retina stellt sich das Fehlen der einzelnen Rezeptoren wie folgt dar.

In der GZS der unbehandelten Kontrollaugen der drei Mausstämme fallen bereits morphologische Unterschiede auf. So ist die Anzahl der Ganglienzellen der $P2Y_1^{-/-}$ -Mäuse signifikant geringer als im unbehandelten Wildtyp- und im unbehandelten $IP_3R2^{-/-}$ -Tier. In der Ganglienzellschicht, deren Zellen bekanntlich sehr empfindlich auf hypoxische Umstände reagieren (Neroev et al. 2010; Neufeld et al., 2002; Selles-Navarro et al., 1996), fand sich postischämisch bei den $P2Y_1$ -defizienten Mäusen ($48,4 \pm 0,7$ %) und den Wildtyp-Mäusen ($49,4 \pm 0,7$ %) eine Zellzahlreduktion auf circa die Hälfte aller Ganglienzellen, während bei den IP_3R2 -defizienten Mäusen die Zahl der Ganglienzellen nur auf $58,8 \pm 1,5$ % vermindert war (s. Abb. 20).

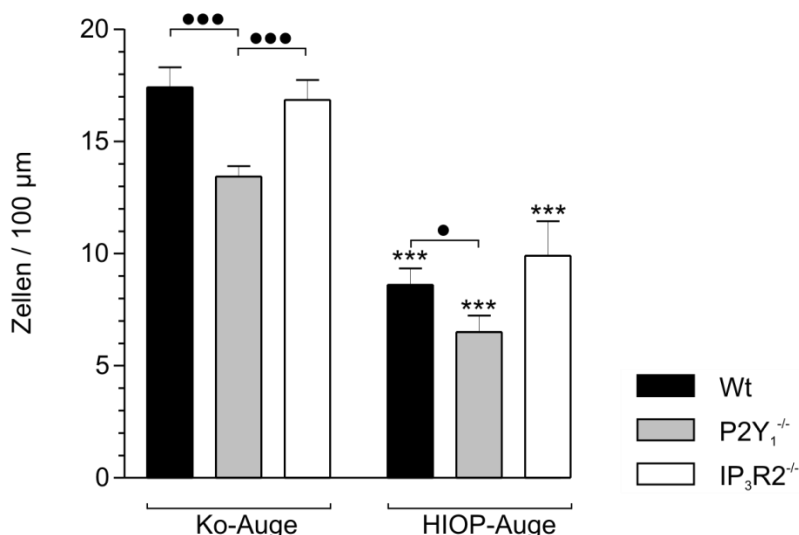


Abbildung 20 Zellzahl der Ganglienzellschicht nach Ischämie (HIOP-Auge) bei Defizit des $P2Y_1$ -Rezeptors ($P2Y_1^{-/-}$), Defizit des IP_3 -Rezeptor ($IP_3R2^{-/-}$) und im Wildtyp (Wt) im Vergleich zum unbehandelten Kontrollauge (KoA). * $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. ● $P < 0,05$, ●●● $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Vergleichstier**

Auch in der inneren Körnerzellschicht, welche von den Zellkörpern der Bipolar-, der Horizontal-, der Amakrin- und der Müller-Zellen gebildet wird (Reichenbach et al., 2010), zeigten sich in den unbehandelten Kontrollaugen bereits geringe quantitative Unterschiede der Zellzahl (Abb. 21). Wie bereits in der GZS beobachtet, waren auch in der IKS der $P2Y_1^{-/-}$ -defizienten Tiere signifikant niedrigere Zellzahlen zu registrieren als beim Wildtyp- und $IP_3R2^{-/-}$ -Tier. Nach experimenteller Ischämie waren wiederum bei allen drei Mauslinien signifikante Zellverluste als Zeichen der Neurodegeneration nachweisbar. Die Zellverluste variierten zwischen $43,5 \pm 3,7$ % bei IP_3R2 -Defizit, $33,4 \pm 4,4$ % bei $P2Y_1$ -Defizit und $35,1 \pm 2,2$ % im Wildtyp. In der IKS fällt das Ausmaß des Zellverlustes bei Defizit des IP_3R2 -Rezeptors -im Gegensatz zur GZS- signifikant stärker aus als beim gleichbehandelten Wildtyp-Tier. Zwischen den $P2Y_1^{-/-}$ -Mäusen und den Wildtypmäusen konnten hingegen keine relevanten Unterschiede der Zellquantität ermittelt werden.

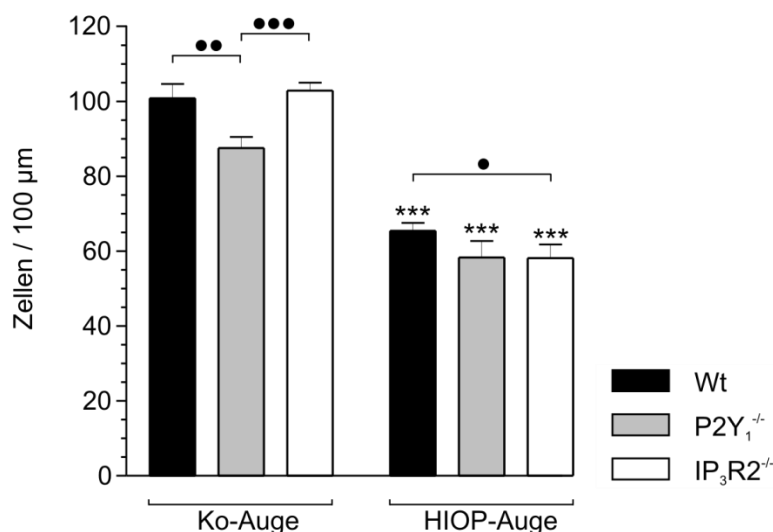


Abbildung 21 Zellzahl der inneren Körnerzellschicht nach Ischämie (HIOP-Auge) bei Defizit des $P2Y_1$ -Rezeptors ($P2Y_1^{-/-}$), Defizit des IP_3 -Rezeptor ($IP_3R2^{-/-}$) und im Wildtyp (Wt) im Vergleich zum unbehandelten Kontrollauge (KoA). * $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. • $P < 0,05$, •• $P < 0,01$, ••• $P < 0,001$: versus Vergleichsschicht des Vergleichstier.**

In der äußeren Körnerzellschicht, der Schicht der Somata der Photorezeptoren, wird der Unterschied des jeweiligen Rezeptor-Defizits im Vergleich zum Wildtyp-Tier besonders deutlich (Abb. 22). Im unbehandelten Auge zeigten sich nur sehr

geringe Unterschiede, während postischämisch deutliche quantitative Veränderungen verzeichnet werden konnten. In Abwesenheit des P2Y₁-Rezeptors war die Zahl der Photorezeptoren postischämisch auf 44,1±14 % verringert, indessen war diese Anzahl bei IP₃R2-Defizit sogar auf 39,3±13 % reduziert. Vergleichsweise konnten beim Wildtyp-Tier noch 62,8±14 % Zellen erfasst werden. Bei Fehlen der Rezeptoren IP₃R2 oder P2Y₁ ist die Zellzahlverminderung als Zeichen der Photorezeptordegeneration signifikant stärker ausgeprägt als beim Wildtyp-Tier.

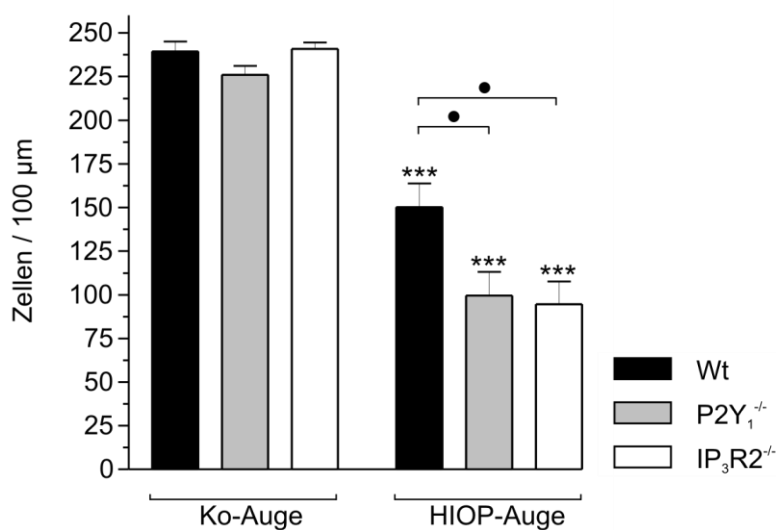


Abbildung 22 Zellzahl der äußeren Körnerzellschicht nach Ischämie (HIOP-Auge) bei Defizit des P2Y₁-Rezeptors (P2Y₁^{-/-}), Defizit des IP₃-Rezeptor (IP₃R2^{-/-}) und im Wildtyp (Wt) im Vergleich zum unbehandelten Kontrollauge (KoA). *** P<0,001: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges. • P<0,05: versus Vergleichsschicht des Vergleichstier.

Hinsichtlich der Dicke der inneren plexiformen Schicht zeigten sich im unbehandelten Kontrollauge bei allen drei untersuchten Mauslinien (Wt, P2Y₁^{-/-}, IP₃R2^{-/-}) keine wesentlichen Unterschiede (s. Abb. 23). Allerdings war bei allen Tieren eine signifikante Abnahme der Schichtdicke der IPS nach hypoxisch-ischämischen Bedingungen zu verzeichnen. Es konnten wiederum keine Unterschiede innerhalb der Rezeptor-defizienten Tiere und im Vergleich zum Wildtyp-Tier nachgewiesen werden.

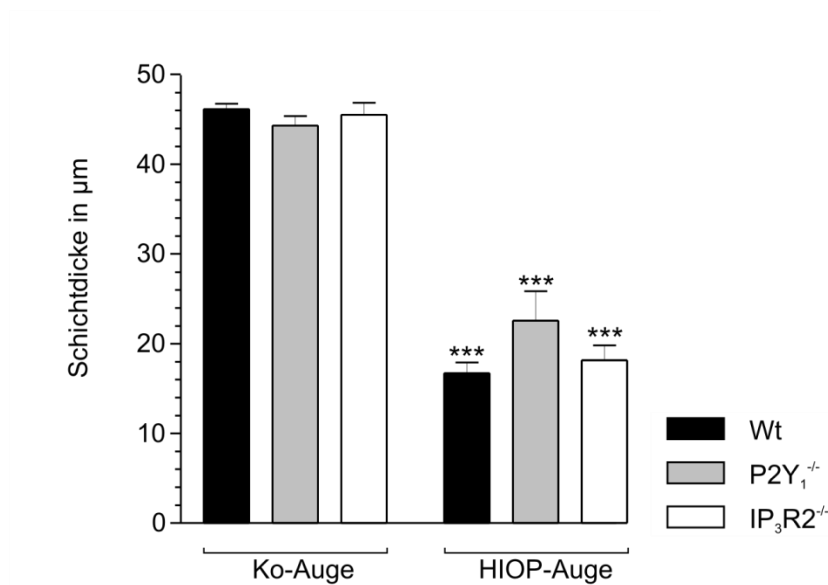


Abbildung 23 Dicke der inneren plexiformen Schicht nach Ischämie (HIOP-Auge) bei Defizit des P2Y₁-Rezeptors (P2Y₁^{-/-}), Defizit des IP₃-Rezeptor (IP₃R2^{-/-}) und im Wildtyp (Wt) im Vergleich zum unbehandelten Kontrollauge (KoA). *** P<0,001: versus Vergleichsschicht des Kontrollauges.

Zusammenfassend konnte speziell in der ÄKS sowohl bei Defizit des P2Y₁-Rezeptors als auch des IP₃R2 eine stärkere Photorezeptordegeneration nach Ischämie-Reperfusion beobachtet werden. Basierend auf diesen Daten, kann vermutet werden, dass beide Rezeptoren durch ihre Schlüsselrolle im Rahmen der volumen-regulatorischen glutamaterg-purinergen Signalkaskade der Müllerzellen auch einen entscheidenden Einfluß (direkt oder indirekt) auf den Grad des Zellverlustes in der Netzhaut unter ischämisch/hypoxischen Bedingungen haben.

3.6. Bestimmung der Apoptoserate mittels TdT (TUNEL)-Assay in IP₃-Rezeptor Typ2-defizienten und P2Y₁-defizienten-Mäusen

Um das Ausmaß der Neurodegeneration nach transienter Ischämie zu verdeutlichen, wurde an Netzhautschnitten einiger P2Y₁- und IP₃R2-defizienter Mäuse sowie vergleichbarer Wildtypiere ein Apoptose-Nachweis mittels TUNEL-Reaktion durchgeführt. Dieser Nachweis wurde jedoch nicht - wie die übrigen Untersuchungen sieben Tage nach Ischämie – sondern bereits einen Tag nach der Ischämie/Reperfusion durchgeführt, da zu vermuten war, dass nach sieben Tagen keine Apoptose mehr nachzuweisen gewesen wäre. In Abbildung 24 ist

dies exemplarisch für 4 Netzhautschnitte dargestellt. Die Apoptose-Rate entspricht dem Anteil apoptotischer Zellen an allen in dem 100µm großen Netzhautabschnitt erkennbaren Zellen (s. Abb. 25).

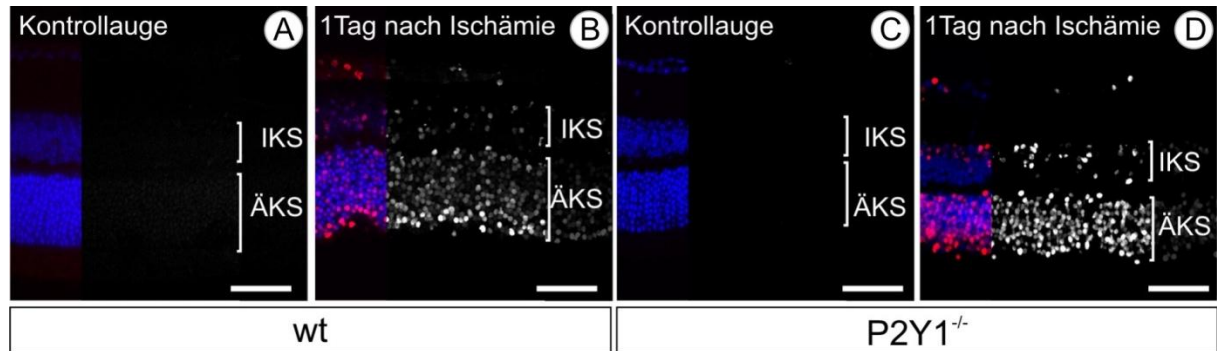


Abbildung 24 Repräsentativer Netzhautschnitt zur Visualisierung der Apoptose mittels TUNEL-Assay im Wildtyp- und P2Y₁-defizienten Tier. (A) Übersicht über die zentrale Netzhaut in einem unbehandelten Kontrollauge eines Wildtypieres. Die nukleären Schichten (IKS, ÄKS) werden durch den Kernfarbstoff ToPro dargestellt (blau). Es sind keine apoptotischen Zellkerne nachweisbar. (B) Netzhautschnitt eines Wildtypieres einen Tag nach Ischämie. Nach TUNEL-Färbung sind die apoptotischen Zellkerne im linken Bildabschnitt (rot) dargestellt. Zur besseren Visualisierung wurden die Netzhautschnitte im Schwarz-Weiß-Bild (jeweils rechter Bildabschnitt) ausgezählt. (C) Übersicht über die zentrale Netzhaut in einem unbehandelten Kontrollauge einer P2Y₁-defizienten Maus. (D) Netzhautschnitt des P2Y₁-defizienten Tieres einen Tag nach transientser Ischämie. Wt, Wildtypmaus; P2Y₁^{-/-}, P2Y₁-defiziente Maus; IKS, innere Körnerzellschicht; ÄKS, äußere Körnerzellschicht. Größenstandard, 50 µm.

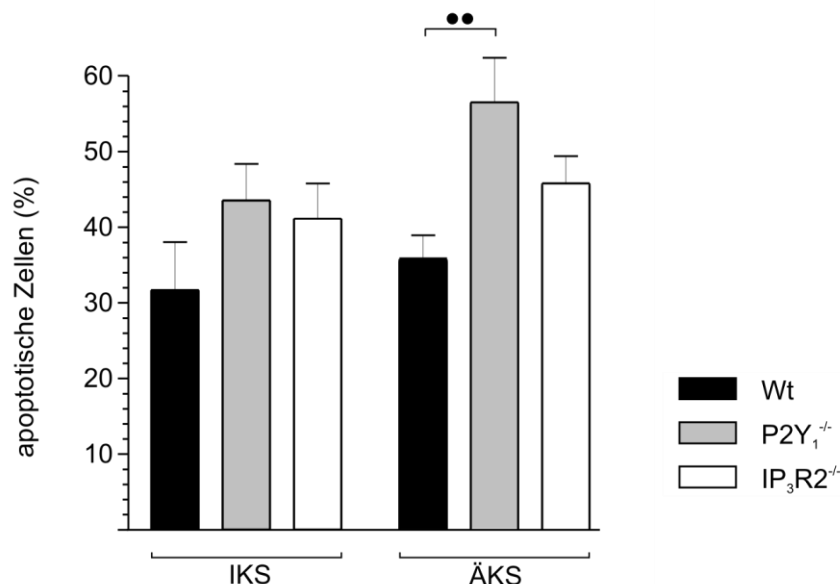


Abbildung 25 Darstellung der Apoptose-Rate (%) der inneren (IKS) und äußeren Körnerzellschicht (ÄKS). •• $P < 0,01$: versus Vergleichsschicht der Wildtyp-Maus.

In der zellreichsten Schicht der Retina, der ÄKS konnten wir in den Netzhautschnitten der zuvor ischämisch behandelten Augen Apoptose-Raten von 35,6 % beim Wt, 45,6 % bei den IP₃R2-defizienten und 56,4 % bei den P2Y₁-defizienten Mäusen feststellen (Abb. 25). Infolge der transienten Ischämie kommt es – insbesondere bei den rezeptordefizienten Mäusen - nachweislich zum programmierten Zelltod von etwa der Hälfte aller vorhandenen Netzhautzellen. Beim Wildtypmausstamm hingegen fällt die Apoptose-Rate mit 35,6 % signifikant geringer aus als beim gleichbehandelten P2Y₁-Auge.

In der IKS konnte dies in ähnlicher Ausprägung bestätigt werden, wobei hier die Apoptose-Rate mit 43,5 % bei den P2Y₁-defizienten Mäusen, 41,1 % bei den IP₃R2-defizienten Mäusen und 31,7 % bei den Wildtyp-Tieren etwas geringer ausfiel, als in der ÄKS.

Tabelle 2 veranschaulicht nochmals alle Ergebnisse der mittels TUNEL-Assay untersuchten Netzhautschnitte. Es wird deutlich, dass einen Tag nach Ischämie/Reperfusion die Gesamtzellzahl in den behandelten Augen (HIOP-Augen) im Vergleich zu den Kontrollaugen nur geringgradig abweicht und dass in den unbehandelten Kontrollaugen keine Apoptose nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 2 *Darstellung der absolute Apoptose-Rate in der inneren (IKS) und äußeren Körnerzellschicht (ÄKS).*

	Kontrollauge		HIOP-Auge	
innere Körnerzellschicht	Zellzahl gesamt	Anteil apoptotischer Zellen	Zellzahl gesamt	Anteil apoptotischer Zellen
P2Y ₁ -defizient (n=4)	90±6	0±0	92±7	42±6
IP ₃ R2-defizient (n=5)	107±7	0±0	94±5	36±5
Wildtyp (n=4)	103±7	0±0	92±6	27±5
äußere Körnerzellschicht				
P2Y ₁ -defizient (n=4)	233±7	0±0	222±12	122±15
IP ₃ R2-defizient (n=5)	232±16	0±0	233±11	102±8
Wildtyp (n=4)	256±14	0±0	237±13	83±10

Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass die Apoptose-Rate bei dem jeweiligen rezeptordefizienten Tier ($P2Y_1^{-/-}$, $IP_3R2^{-/-}$) im Vergleich zum Wildtyp tier etwas höher ausfällt (s. Tab. 2 und Abb. 25), signifikant ($P < 0,01$) war der Unterschied jedoch nur in der äußeren Körnerzellschicht (s. Abb. 25).

4 Diskussion

Studien der letzten Jahre liefern zunehmend Hinweise dafür, dass bei verschiedenen Netzhauterkrankungen pathologische Veränderungen der Volumenregulation der Müllerzellen eine Rolle spielen. Bisherige Untersuchungen (Pannicke et al., 2004 und 2006; Wurm et al., 2006) konnten nachweisen, dass ein Verlust der Volumenregulation der Müllerzellen zu einer Störung der Volumenhomöostase der Retina führt. Pannicke et al. (2004) zeigten, dass es in postischämischen Retinae –im Gegensatz zu deren Kontrollen- unter hypotonen Bedingungen zu einem Anschwellen von Müllerzellen kommt. Hier liegt eine Reduktion der einwärtsgleichrichtenden Kaliumströme aufgrund der Herunterregulation der Kir4.1- Expression zu Grunde. Bei gleichbleibendem K⁺-Einstrom über die quantitativ unverändert exprimierten Kir2.1-Kanäle und vermindertem K⁺-Ausstrom kommt es zu einer Akkumulation von Kalium in der Zelle und einem daraus resultierenden Wassereinstrom (osmotischer Gradient) mit Schwellung der Zellen (Dmitriev et al., 1999).

Wurm et al. (2008) erbrachten den Nachweis, dass die Fähigkeit der Volumenregulation gliotisch veränderter Müllerzellen durch Aktivierung einer komplexen glutamaterg-purinergen Signalkaskade wieder hergestellt werden kann. Aus Vorarbeiten meiner Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass in allen in meiner Arbeit verwendeten Knockout-Mausmodellen die Volumenregulation der Müllerzellen gestört ist, da Schlüsselemente der Signalkaskade inaktiviert worden sind (Wurm et al., 2010, Grosche et al., 2013). Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob sich die eingeschränkte Müllerzellfunktion (bedingt durch das Fehlen des P2Y₁-Rezeptors, des IP₃R2 bzw. der Expression des dnSNARE-Proteins) unter den extremen Stressbedingungen einer Ischämie auf das Überleben von Nervenzellen auswirkt. Hierzu wurden die Zellen der Ganglien-, sowie der inneren und äußeren Körnerzellschicht aller drei genetisch veränderten Mauslinien quantitativ erfasst und mit Wildtypmäusen verglichen.

4.1. Effekt der transgenen Überexpression von dnSNARE in Müllerzellen im Ischämie/Reperfusionsmodell

Bisherige Untersuchungen an dnSNARE-Mäusen konnten bereits einen entscheidenden Einfluss der vesikulären Transmitterfreisetzung von z.B. ATP oder Adenosin aus Astrozyten auf die synaptische Aktivität von Nervenzellen nachweisen (Pascual et al. 2005).

Ziel der Arbeit meiner Arbeitsgruppe war es unter anderem, den Einfluss der Expression des dominant negativen SNARE-Proteins auf die Freisetzung des Transmitters Glutamat und die daraus resultierende Aktivierung der glutamaterg-purinergen Signalkaskade zu untersuchen. Parallel zu den in der vorliegenden Dissertationsschrift vorgestellten Arbeiten wurde untersucht, wie die Expression des dominant negativen SNARE-Proteins die Freisetzung des Transmitters Glutamat und die daraus resultierende Aktivierung der glutamaterg-purinergen Signalkaskade beeinflusst. Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass die Volumenregulation von Müllerzellen bei dnSNARE-Mäusen insofern gestört ist, als dass der durch VEGF induzierte schwellungsinhibitorische Effekt nicht mehr zu beobachten ist (Grosche et al., 2013). Erst nach Applikation von Glutamat konnte das Anschwellen der transgen-exprimierenden Müllerzellen verhindert werden. Letztlich haben die Experimente mit dnSNARE-Mäusen somit zwei wichtige Erkenntnisse geliefert: 1. Glutamat wird von Müllerzellen wirklich durch Exozytose aus Vesikeln freigesetzt, das war zuvor zwar vermutet, aber nicht sicher nachgewiesen worden. 2. Die vesikuläre Glutamatfreisetzung spielt eine Rolle bei der Volumenregulation.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen hinsichtlich der Quantität der Zellen der unbehandelten Kontrollaugen in allen untersuchten Retinaschichten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Daraus schließe ich, dass die durch die dnSNARE-Expression bedingte Funktionseinschränkung der Müllerzellen unter normalen physiologischen Bedingungen von den Zellen kompensiert werden kann und zu keinem messbaren Zellverlust führt. Eine mögliche Erklärung des fehlenden Effektes des Verlustes der vesikulären Glutamatfreisetzung von Müllerzellen auf die Morphologie der Retina und entsprechend auf deren Funktion im unbehandelten Auge ist die Limitierung des transgenen Mausmodells. Denn

nachweislich zeigen nur circa 55% der Müllerzellen die Transgenexpression. Möglicherweise verfügen die nicht-transgen-exprimierenden Müllergliazellen über Kompensationsmechanismen, welche das Funktionsdefizit der dnSNARE-exprimierenden Müllerzellen ausgleichen.

Postischämisch war bei beiden Mauslinien (dnSNARE und Wildtyp) in allen untersuchten Retinaschichten erwartungsgemäß eine deutliche Zellzahlverminderung zu registrieren. Interessanterweise zeigt sich aber in den postischämischen Retinae der dnSNARE-Mäuse eine geringere Degeneration von Nervenzellen als beim gleichbehandelten Wildtyp. Damit resultiert aus der eingeschränkten/verminderten vesikulären Glutamatfreisetzung (Transmitterfreisetzung) aus Müllerzellen eine quantitativ geringere Zellschädigung als beim gleichbehandelten Wildtypmausstamm. Das kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass das Glutamat neben der beschriebenen autokrinen Wirkung auf die Volumenregulation der Müllerzelle selbst auch weitere verschiedene Funktionen hat. So könnte das von Müllerzellen abgegebene Glutamat neuronale Rezeptoren aktivieren und somit zur Exzitotoxizität z.B. unter ischämischen Bedingungen beitragen. Aus unveröffentlichten Daten (Grosche) ist bekannt, dass die Freisetzung von Glutamat bei dnSNARE-Mäusen eingeschränkt ist. Dies könnte eine Ursache für den geringeren Zellverlust nach Ischämie in Netzhäuten von dnSNARE-Mäusen sein.

Von Slezak et al. (2012) wurde gezeigt, dass die Ganglienzellen in retinalen Flachpräparaten von Wildtypmäusen schwellen, wenn VEGF auf die Netzhaut gegeben wird. Bei BoNT/B-Mäusen (exprimieren das die Exozytose blockende Botulinumneurotoxin spezifisch in Müllerzellen; vergleichbar in ihrem Phänotyp zu dnSNARE-Mäusen) unterbleibt diese Schwellung, demnach wird die Schwellung im Wildtyp durch das von Müllerzellen freigesetzte Glutamat verursacht. Hier hat also das von Gliazellen freigesetzte Glutamat auch eine potentiell neuronenschädigende Wirkung. Der Beitrag des unter ischämischen Bedingungen vermehrt freigesetzten glialen Glutamates zur neuronalen Übererregung (und einer daraus resultierenden Neurodegeneration) wurde bereits von anderen Autoren in der Literatur diskutiert (Pascual et al., 2012; Rossi et al., 2000; 2007; 2009). Mein Befund einer verbesserten neuronalen Überlebensrate in dnSNARE-

Mäusen mit verminderter Glutamatfreisetzung würde diese These weiter unterstützen.

In zukünftigen Studien wäre es deshalb interessant zu untersuchen, inwieweit eine pharmakologische Intervention gegen eine gliale Transmitterfreisetzung putativ positive Effekte bei der Behandlung von durch Ischämie geschädigten Gewebes hat.

4.2. Effekt des P2Y₁-Rezeptor-Defizits auf die Morphologie der Retina

Wie bereits in Kapitel 1.5. ausführlich erläutert, nehmen P2Y₁-Rezeptoren im sequentiellen Ablauf der glutamaterg-purinergen Signalkaskade eine zentrale Stellung ein. Nach der exozytotischen Freisetzung von Glutamat führt dieses über die Stimulation metabotroper Glutamat-Rezeptoren zu einer Freisetzung von endogenem ATP, welches wiederum nach seiner Umwandlung in ADP den purinergen P2Y₁-Rezeptor stimuliert. Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors führt dann über weitere Zwischenschritte der Signalkaskade letztendlich zum Öffnen von Kalium- und Chloridkanälen und damit zur Hemmung einer möglichen Gliazellschwellung (Wurm et al., 2008). In bisherigen Untersuchungen von P2Y₁-defizienten Mäusen konnte bereits die Wichtigkeit dieser glutamaterg-purinergen Signalkaskade für die Volumenregulation von Müllergliazellen nachgewiesen werden (Wurm et al. 2009; Wurm et al. 2010). Außerdem war bereits bekannt, dass Tiere mit P2Y₁-Defizit -trotz normaler Kaliumleitfähigkeit- eine gestörte Volumenregulation aufweisen (Wurm et al.; 2010).

Um zu prüfen, ob das Fehlen des P2Y₁-Rezeptors und die daraus resultierende Störung der Müllerzellfunktion zu morphologischen Veränderungen der Mausretina führen, wurden Netzhautschnitte immunhistochemisch aufbereitet, mikroskopisch dargestellt und computergestützt ausgezählt. Das Defizit des P2Y₁-Rezeptors führt nach einer transienten Ischämie (HIOP) zu einer stärkeren Neurodegeneration von Netzhautzellen als beim gleichbehandelten Wildtypier. Signifikante Unterschiede konnten nur für die äußere Körnerzellschicht nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass der P2Y₁-Rezeptor vor allem für die Interaktion von Müllerzellen und Photorezeptoren wichtig ist. Eine mögliche Ursache dafür könnte

die durch das Fehlen des P2Y₁-Rezeptors bedingte Störung der Volumenregulation der Müllerzellen sein. Die Daten bestätigen damit die bisherigen Ergebnisse von Wurm et al. 2009 und 2010 bezüglich der essentiellen Bedeutung der glutamaterg-purinergen Signalkaskade für die Volumenregulation von Müllerzellen. Ausgehend von meinen Ergebnissen, lässt sich vermuten, dass das Fehlen des P2Y₁-Rezeptors über eine „Blockade“ der glutamaterg-purinergen Signalkaskade zu einem mangelnden Ausgleich der Ionenkonzentration bei neuronaler Erregung und damit zum ungehinderten Anschwellen der Müllerzellen führt. Die nachgewiesenen morphologischen Veränderungen der Mausnetzhaut stützen wiederum die Annahme, dass Müllergliazellen, wie auch Astrozyten durch die glutamaterg-purinerge Signalvermittlung in ein neuronal-gliales Kommunikationsnetzwerk integriert sind (Bezzi und Volterra 2001, Inoue et al. 2007) und die Störung der Volumenregulation der Müllerzellen eine Beeinträchtigung der Volumen- und Ionenhomöostase der gesamten Retina mit den vorgenannten Zellschädigungen nach sich zieht.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurden alle in meiner Doktorarbeit untersuchten Mauslinien hinsichtlich der Netzhautmorphologie in früheren Untersuchungen nur grob charakterisiert um schwerwiegende Auswirkungen der genetischen Manipulation auszuschließen. Es fanden sich keine Hinweise auf einen fortschreitenden Zellverlust. Ebenfalls konnte keine Aktivierung der Müllerglia als Hinweis auf eine mögliche Neurodegeneration festgestellt werden (Wurm et al., 2010). Eine quantitative Analyse der zellulären Zusammensetzung der Netzhaut in diesen Tieren ist allerdings noch nicht erfolgt. Interessant war deshalb, dass sich in meinen Untersuchungen bereits in den unbehandelten Kontrollaugen der Ganglien- und der inneren Körnerzellschicht signifikante Unterschiede der Quantität der Zellen zeigten. Auffällig war hier insbesondere bereits die reduzierte Anzahl von Neuronen der P2Y₁-defizienten Tiere.

Das Vorkommen des P2Y₁-Rezeptors ist vielfältig und nicht spezifisch auf Müllerzellen beschränkt. Zu den weiteren Lokalisationen im ZNS zählen u.a. Astrozyten, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und sensorische Neuronen (Fischer und Krügel 2007). P2Y₁-defiziente Mäuse zeichnen sich durch die fehlende Expression des P2Y₁-Rezeptors auf allen Zellen – nicht nur spezifisch auf Müllerzellen – aus. Möglicherweise ist daher eine auf dem Rezeptordefizit

beruhende Neurodegeneration -infolge einer gestörten Funktion der Zellen selbst oder indirekt durch den Funktionsverlust der Müllerzellen - die Folge. Gegen eine permanent ablaufende Neurodegeneration in der adulten Netzhaut der P2Y₁-defizienten Tiere spricht allerdings, dass ich in den TUNEL-Färbungen zur Detektion von apoptotischen Zellen keine Unterschiede zwischen Wildtyptieren und den P2Y₁-defizienten Tieren feststellen konnte (s. Tab 2). Alternativ könnte die geringere Zellzahl in den inneren Netzhautschichten der P2Y₁-defizienten Mäuse durch eine verminderte Proliferation der retinalen Vorläuferzellen begründet sein. Aus diesen Radialgliazellen gehen während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung durch asymmetrische Zellteilung alle neuronalen Zelltypen der Netzhaut hervor (Cepko et al., 1996; Rapoport et al., 2004). Letztlich differenzieren die Radialgliazellen ab dem Ende der ersten Postnatalwoche zu funktionellen Müllerzellen (Wurm et al., 2006; 2009). Frühere Arbeiten aus meiner Arbeitsgruppe belegen, dass der P2Y₁-Rezeptor sowohl auf den Vorläuferzellen (an Postnataltag 5) und in allen weiteren Stadien der Müllerzelldifferenzierung von den Zellen exprimiert wird (Wurm et al., 2009). Weiterhin ist bekannt, dass die Stimulation des Rezeptors (neben dessen Rolle bei der Volumenregulation) unter anderem auch die Proliferation von Müllerzellen in der postnatalen Netzhaut und Müllerzellen in Kultur anregt (Moll et al., 2002; Nunes et al., 2007; Sholl-Franco et al., 2010). In Zusammenschau dieser Datenlage könnte deshalb die geringere Zelldichte in der inneren Netzhaut unbehandelter P2Y₁-defizienter Tiere weniger durch eine Degeneration, sondern vielmehr durch eine verminderte Bildung der entsprechenden Zelltypen erklärt werden. Diese Hypothese muss allerdings in weiteren Experimenten z.B. durch Charakterisierung der Postnatalentwicklung in den entsprechenden Mauslinien bestätigt werden.

4.3. Vergleich von IP₃Rezeptor Typ2- und P2Y₁-defizienten Mäusen im Ischämie/ Reperusionsmodell

Aus früheren Untersuchungen IP₃R2-defizienter Mäuse (Lipp et al., 2009; Wurm et al., 2010) war bekannt, dass es unter hypoosmolaren Bedingungen zu einer unmittelbaren Gliazellschwellung kommt. Diese Studien konnten also bereits die Rolle des IP₃R2 für die Volumenregulation der Müllergliazellen belegen. Ziel

meiner Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit eine vorliegende Störung dieser essentiellen Müllerzellfunktion Auswirkungen auf die Morphologie der Mausretina hat.

In der quantitativen Analyse der Netzhautschichten der unbehandelten Kontrollaugen IP_3R2 -defizienter Tiere zeigten sich im Vergleich zum Wildtyptier keine signifikanten Unterschiede, was darauf schließen lässt, dass ein Verlust des IP_3R2 unter normalen physiologischen Bedingungen keine Auswirkungen auf die Morphologie der Mausnetzhaut hat. Möglicherweise sind hier noch unbekannte Kompensationsmechanismen der Zellen verantwortlich dafür, dass die nachgewiesene Störung der Volumen- und Ionenregulation der Müllerzellen, unter Normalbedingungen noch nicht zu einer Beeinträchtigung der Volumenhomöostase der gesamten Retina führt. Unter ischämisch-hypoxischen Bedingungen konnten wir wiederum feststellen, dass die Retina IP_3R2 -defizienter Mäuse in der IKS und der ÄKS eine stärkere Zellschädigung aufweist als die gleichbehandelter Wildtyp-Mäuse. Das Defizit des IP_3R2 führt meinen Ergebnissen zufolge über eine Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung in den Gliazellen und den daraus resultierenden zellulären Funktionsänderungen zu einer stärkeren Degeneration von Netzhautzellen im untersuchten Ischämie/Reperusionsmodell. Diese Daten bestätigen zum einen die Ergebnisse bisheriger Studien (Lipp et al., 2009; Wurm et al., 2010) insofern, dass der IP_3R2 in seiner Vermittlung eines endogenen Ca^{2+} -Signals eine entscheidende Rolle im Ablauf der glutamaterg-purinergen Signalkaskade und damit für die Volumenregulation von Müllerzellen spielt. Zum Anderen bestätigen die Daten die Annahme, dass eine Störung der Müllerzellfunktion, wie sie hier durch das Defizit des IP_3R2 hervorgerufen/provoziert wird, über eine Beeinträchtigung der Volumen- und Ionenhomöostase der Retina unter extremen Stressbedingungen (wie z.B. einer Ischämie) zu einer nachweislichen Schädigung von Nervenzellen führt. Oder andersherum ausgedrückt – die Funktion der Müllerzellen zum Erhalt der Ionen- und Volumenhomöostase ist essentiell für das Überleben von retinalen Neuronen vor allem unter pathologischen Stressbedingungen. Ist diese Funktion gestört, hat das ein vermehrtes Absterben der umliegenden Zellen zur Folge. Dabei scheinen vor allem Photorezeptoren auf die Unterstützung der Müllerzellen angewiesen zu sein, da hier die deutlichsten Unterschiede zwischen Wildtyptier und IP_3R2 -defizienten Tieren festgestellt werden konnten.

Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich bei den ischämischen Netzhäuten P2Y₁-defizienter Mäuse, wodurch auch die Annahme bestätigt wird, dass der nachgeschaltete intrazelluläre Signalweg nach P2Y₁-Rezeptor-Stimulation maßgeblich durch IP₃R2-Aktivierung vermittelt wird. Auch bei P2Y₁-defizienten Tieren fand sich vor allem in der äußeren Körnerschicht ein deutlich stärkerer Zellverlust durch apoptotischen Zelltod der Photorezeptoren verglichen mit den Wildtyptieren. Ursache dafür kann, ähnlich wie bei den IP₃R2-defizienten Mäusen, die durch den fehlenden P2Y₁-Rezeptor bedingte eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Müllerzellen sein. Die Beobachtung der besonderen Abhängigkeit der Photorezeptoren von funktionellen Müllerzellen wird durch Daten aus der Arbeit von Shen et al. (2012) unterstützt. Die Autoren beschreiben, dass nach gezielter Ablation von Müllerzellen in der adulten Netzhaut der Maus neben Veränderungen des retinalen Gefäßplexus vor allem Photorezeptoren vom Verlust der Müllerzellen betroffen sind und absterben.

Einen zusammenfassenden Überblick über mögliche protektive und schädigende Effekte, welche in den einzelnen Mausmodellen beobachtet wurden, gibt Abbildung 26. Aus Arbeiten meiner Arbeitsgruppe ist bekannt, dass in allen drei Mauslinien die Fähigkeit der Müllerzellen zur Volumenregulation gestört ist. Die Analyse der Auswirkung der einzelnen Knockouts auf das Überleben der Netzhautzellen nach Ischämie/Reperfusion ergab allerdings ein differenzierteres Bild. Während bei den P2Y₁^{-/-}- und den IP₃R2^{-/-}-defizienten Mäusen eine - im Vergleich zu den Wildtypmäusen- stärkere Degeneration von Nervenzellen nach Ischämie/Reperfusion erfasst wurde, resultiert bei den dnSNARE-Mäusen postischämisch eine höhere Überlebensrate der Neuronen als bei den entsprechend behandelten Wildtyp-Mäusen.

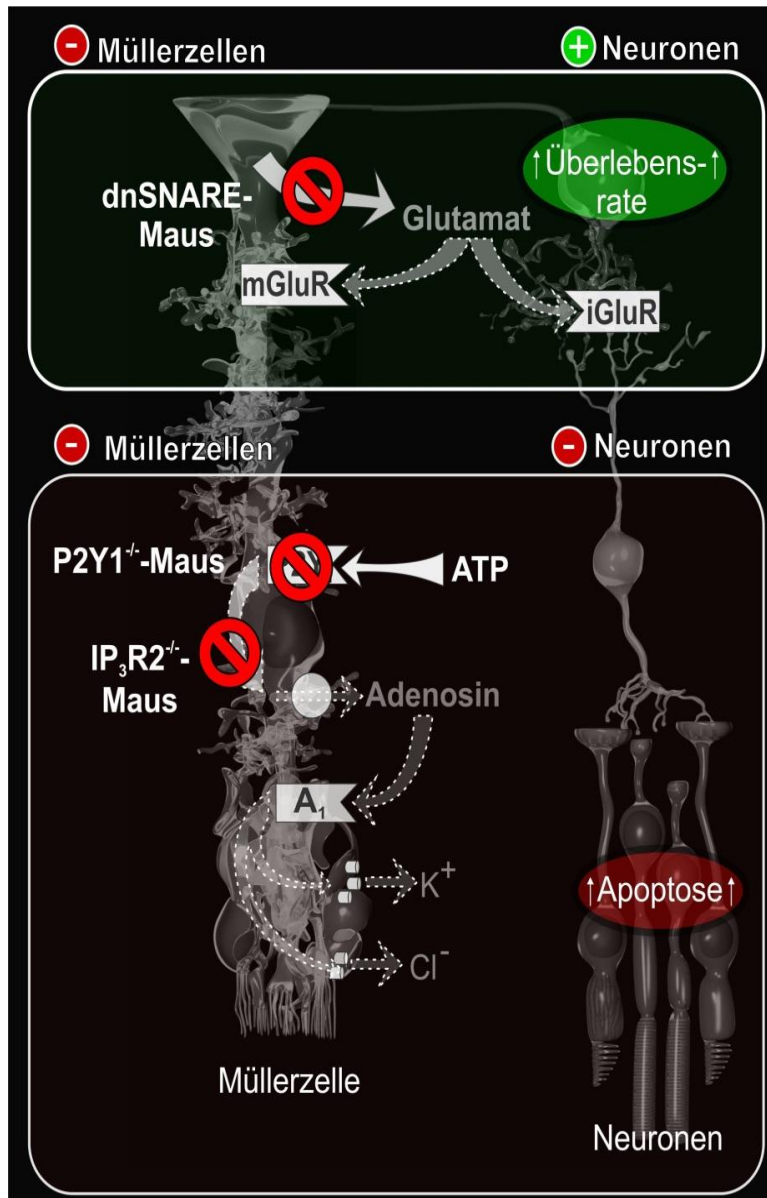


Abbildung 26 Schematische Zusammenfassung der Auswirkung der Ischämie in den untersuchten Mausmodellen.

Die gestörte Exozytose von Glutamat in den dnSNARE-Mäusen führt zu einer eingeschränkten Fähigkeit zur Volumenregulation der Müllerzellen. Allerdings scheint die verminderte gliale Glutamatfreisetzung protektiv für benachbarte Nervenzellen nach Ischämie zu sein. Die beobachtete höhere Überlebensrate könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass es in diesen Tieren aufgrund der verminderten Glutamatfreisetzung zu einer weniger stark ausgeprägten Ischämie-bedingten Exzitotoxizität, welche durch Überstimulation ionotroper Glutamatrezeptoren ($iGluR$) vermittelt wird, kommt. Dagegen fand sich sowohl in den P2Y₁-defizienten als auch in den IP₃R2-defizienten Mäusen (für beide Mauslinien wurde ebenfalls eine gestörte Müllerzellfunktion beschrieben) ein verstärkt auftretendes Absterben retinaler Zellen nach Ischämie/Reperfusion. In diesen Tieren überwiegen somit die negativen Auswirkungen der eingeschränkten Müllerzellfunktion zum Erhalt der retinalen Ionen- und Volumenhomöostase.

5 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr.med.

Morphologische Veränderungen in der Mausnetzhaut nach Ischämie/Reperfusion in verschiedenen genetisch veränderten Mauslinien

eingereicht von: Ina Frommherz

angefertigt: 01/2011–09/2013 in Leipzig, Medizinische Fakultät Universität Leipzig, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung Pathophysiologie der Neuroglia

betreut von: Prof. Dr. med. habil. Andreas Reichenbach
Prof. Dr. rer. nat. habil. Antje Grosche, geb. Wurm

eingereicht September 2013

Die Müllerzelle – als die dominierende Gliazelle der Netzhaut – nimmt vielfältige Aufgaben und Funktionen in der Netzhaut des Auges wahr. Von essentieller Bedeutung sind diese retinaspezifischen Gliazellen insbesondere für die Volumen- und Ionenhomöostase der Retina. Pathologische Veränderungen der Müllerzellfunktionen - speziell der Fähigkeit zur Steuerung der müllerzelleigenen Volumenregulation – können über eine Flüssigkeitsakkumulation im retinalen Gewebe zu Ödemen der Netzhaut führen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, eine Charakterisierung von Netzhautschnitten dreier genetisch veränderter Mauslinien (dnSNARE, P2Y₁-defizient und IP₃R2-defizient) hinsichtlich der Quantität der retinalen Zellen vorzunehmen und mit Wildtypmäusen zu vergleichen. Zum anderen sollte

untersucht werden, inwiefern sich die genetischen Veränderungen auf Degenerationserscheinungen nach transienter Ischämie auswirken.

Im hier verwendeten Tiermodell (Ischämie-Reperfusions-Modell) wurde durch Anheben des intraokulären Druckes über 160mmHg eine 90minütige Ischämie mit anschließender Reperfusion induziert, um nachfolgend eine mikroskopisch-computergestützte Untersuchung der ischämisch-hypoxischen behandelten Mausnetzhäute sowie der unbehandelten Kontrollaugen durchzuführen.

Während aus Vorarbeiten bereits bekannt war, dass die Volumenregulation der Müllerzellen in allen hier verwendeten Mauslinien gestört ist (Wurm et al., 2010, Grosche et al., 2013), waren bisher unter normalen physiologischen Bedingungen keine morphologischen Veränderungen der Mausretina aufgefallen. Umso interessanter ist das Ergebnis dieser Arbeit, dass in den unbehandelten Netzhautschnitten der P2Y₁-defizienten Mäuse bereits signifikant weniger Zellen in Ganglienzell- und innerer Körnerzellschicht festgestellt wurden als bei allen anderen untersuchten Mauslinien. Sowohl das Defizit des IP₃R2 als auch die Überexpression des dominant-negativen SNARE-Proteins führten unter Normalbedingungen hingegen zu keinen morphologischen Veränderungen der Mausretina.

Erwartungsgemäß waren nach transienter Ischämie in allen untersuchten Netzhautschnitten ein signifikanter Zellverlust sowie eine Abnahme der Schichtdicke der inneren plexiformen Schicht zu verzeichnen. Doch obwohl bei allen drei Mauslinien eine Beeinträchtigung der glutamaterg-purinergen Signalkaskade – auf unterschiedlichen Ebenen - vorliegt, zeigten sich doch unterschiedlich starke Ausprägungen der Neurodegeneration nach retinaler Ischämie und anschließender Reperfusion. So konnte ich in den Netzhautschnitten der dnSNARE-Mäuse eine quantitativ geringer ausgeprägte Degeneration von Nervenzellen feststellen als in den Netzhäuten der Wildtyp-Mäuse. Im Gegensatz dazu war der Zellverlust nach transienter Ischämie in den P2Y₁- und IP₃R2-defizienten Mäusen stärker ausgeprägt als bei den entsprechend behandelten Wildtyp-Mäusen. Bei letztgenannten (P2Y₁-defizient, IP₃R2-defizient) stehen also der Funktionsverlust der Müllerzellen und die daraus resultierende Schädigung der Retina im Vordergrund. Parallel durchgeführte physiologische Untersuchungen an dnSNARE-Mäusen haben gezeigt, dass Glutamat von

Müllerzellen aus Vesikeln freigesetzt wird und dass diese vesikuläre Glutamatfreisetzung eine bedeutende Rolle in der Volumenregulation von Müllerzellen spielt. Hier scheint es aber so zu sein, dass die gestörte Volumenregulation für die Neurodegeneration weniger von Bedeutung ist. Hingegen wirkt es sich anscheinend neuroprotektiv aus, dass die Gliazellen kein Glutamat vesikulär ausschütten können und damit eine verminderte Exzitotoxizität zu einem besseren Überleben der Nervenzellen nach Ischämie beiträgt.

Abschließend betrachtet können die Ergebnisse dieser Arbeit für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien und Behandlungskonzepte zur Vermeidung postischämischer und posttraumatischer Gliazellschwellungen von Bedeutung sein.

6 Literaturverzeichnis

Bezzi P, Volterra A. 2001. A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol.* 11(3):387-94.

Bringmann A, Uckermann O, Pannicke T, Iandiev I, Reichenbach A, Wiedemann P. 2005. Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta Ophthalmol Scand*, 83:528-538.

Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*, 25:397-424.

Bringmann A, Wiedemann P. 2012. Müller Glial Cells in Retinal Disease. *Ophthalmologica*, 227:1-19.

Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D. 1996. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:589–595.

Dirnagl U, Meisel A. 1999. Zerebrale Ischämie. *Handbuch der molekularen Medizin Band 5*, Ganten A (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin: 510-533.

Dmitriev AV, Govardovskii VI, Schwahn HN, Steinberg RH. 1999. Light-induced changes of extracellular ions and volume in the isolated chick retina-pigment epithelium preparation. *Vis Neurosci* 16:1157–1167

Färber K, Kettenmann H. 2005. Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48(2):133-43.

Fischer W. und Krügel U. 2007. P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain. *Curr Med Chem*, 14, 2429-55.

Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck J. 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:8287-8292.

Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, Lieth E, Tarbell JA. 1999. The molecular structure and function of the inner blood-retinal barrier. *Penn State Retina Research Group. Doc Ophthalmol*; 97(3-4):229-237.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3):493-501.

Ghosh F, Wasselius J. 2002. Muller cells in allogeneic adult rabbit retinal transplants. *Glia*. 40:78-84.

Grehn F. 2008. *Augenheilkunde*. 30. überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer, Heidelberg: 210-216.

Grosche A, Wagner L, Pfrieger FW, Haydon PG, Reichenbach A. 2013. Gliotransmitter release from retinal (Müller) glial cells. *Glia* 61, Suppl. 1:S 34.

Hofman E. 2001. *Medizinische Biochemie*. 3. Auflage UNI-MED Verlag: 133-143.

Hohenstein B, Renk S, Lang K, Daniel C, Freund M, Léon C, Amann KU, Gachet C, Hugo CP. 2007. P2Y1 gene deficiency protects from renal disease progression and capillary rarefaction during passive crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.*, 18(2):494-505.

Fine BS, Brucker AJ. 1981. Makula edema and cystoids macula edema. *Am J Ophthalmol.*;92(4):466-81

Ferris FL, III, Patz A. 1984. Macular edema. A complication of diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol*; 28 Suppl:452-461.

Inoue K, Koizumi S, Tsuda M. 2007. The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions. *J Neurochem*, 102: 1447-58.

Kampik A , Grehn F. 2008. Augenärztliche Differentialdiagnostik. Georg Thieme Verlag. 207-208

Karwoski CJ, Lu HK, Newman EA. 1989. Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Müller (glial) cells. *Science*, 244:578-580.

Kimelberg HK. 1995. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg*, 83(6):1051-9.

Kofuji P und Newman EA. 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4): 1045-1056.

von Kügelgen I. 2006. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther.*;110(3):415-32.

von Kügelgen I. 2008. Pharmacology of mammalian P2X- and P2Y-receptors. *BIOTREND Reviews* No. 03,

Lenain N, Freund M, Léon C, Cazenave JP, Gachet C. 2003. Inhibition of localized thrombosis in P2Y1-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a P2Y1 receptor antagonist. *J Thromb Haemost*, 1(6):1144-9.

Lipp S, Wurm A, Pannicke T, Wiedemann P, Reichenbach A, Chen J, Bringmann A. 2009. Calcium responses mediated by type 2 IP3-receptors are required for osmotic volume regulation of retinal glial cells in mice. *Neurosci Lett*, 457:85-88.

Matsui K, Hosoi N, Tachibana M. 1999. Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. *J Neurosci*, 19(16): 6755-66.

Moll V, Weick M, Milenkovic I, Kodali H, Reichenbach A, Bringmann A. 2002. P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial DNA synthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(3):766-73.

Nagelhus EA, Horio EY, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia*, 26(1):47-54.

Neroev VV, Zueva MV, Kalamkarov GR. 2010. Molecular mechanisms of retinal ischemia. *Vestn Oftalmol.*, 126(3):59-64.

Neufeld AH, Kawai Si, Das S, Vora S, Gachie E, Connor JR, Manning PT. 2002. Loss of retinal ganglion cells following retinal ischemia: the role of inducible nitric oxide synthase. *Exp Eye Res*, 75(5):521-8.

Newman EA, Reichenbach A. 1996. The Müller cell: a functional element in the retina. *Trends Neurosci*, 19:307-12.

Nunes PH, Calaza Kda C, Albuquerque LM, Fragel-Madeira L, Sholl-Franco A, Ventura AL. 2007. Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of cell progenitors in the intact embryonic retina. *Int J Dev Neurosci*, 25(8):499-508.

Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O, Biedermann B, Kutzera F, Wiedemann P, Wolburg H, Reichenbach A, Bringmann A. 2004. A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol Cell Neurosci*, 26:493-502.

Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, Uckermann O, vom Hagen F, Reichenbach A, Wiedemann P, Hammes H-P, Bringmann A. 2006. Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes*, 55:633-639.

Papadopoulos MC, Saadoun S, Davies DC, Bell BA. 2001. Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *Br J Neurosurg*, 15(2):101-8.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, 310(5745):113-6.

Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A. 2012. Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 109(4):E197-205.

Raap M, Biedermann B, Braun P, Milenkovic I, Skatchkov SN, Bringmann A, Reichenbach A. 2002. Diversity of Kir channel subunit mRNA expressed by retinal glial cells of the guinea-pig. *Neuroreport*, 13(8):1037-40.

Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM. 2004. Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol*, 474:304–324

Reichenbach A, Ziegert M, Schnitzer J, Pritz-Hohmeier S, Schaaf P, Schober W, Schneider H. 1994. Development of the rabbit retina. V. The question of 'columnar units'. *Dev Brain Res*, 79:72-84.

Reichenbach A. 1999. Neuroglia – Das andere zelluläre Element im Nervensystem: Die Müllersche Gliazelle. 1st ed. Wessobrunn: Socio-medico Verlagsgesellschaft GmbH Medizin + Wissenschaft.

Reichenbach A. 2008. Die Wirbeltiernetzhaut – ein merkwürdiges Sinnesorgan. Verlag der sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig

Reichenbach A., Bringmann A. 2010. Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. Springer: New York, Dordrecht, Heidelberg, London.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403(6767):316-21.

Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. 2007. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci*, 10(11):1377-86.

Rossi D, Volterra A. 2009. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull*, 80(4-5):224-32.

Sachsenweger M. 2003. Augenheilkunde. Duale Reihe, 2. Auflage, 248-251

Sahel JA, Albert DM, Lessell S. 1990. Proliferation of retinal glia and excitatory amino acids. *Ophtalmologie*. 4:13-6.

Selles-Navarro I, Villegas-Pérez MP, Salvador-Silva M, Ruiz-Gómez JM, Vidal-Sanz M. 1996. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 37(10):2002-14.

Shen W, Fruttiger M, Zhu L, Chung SH, Barnett NL, Kirk JK, Lee S, Coorey NJ, Killingsworth M, Sherman LS, Gillies MC. 2012. Conditional Müller Cell Ablation Causes Independent Neuronal and Vascular Pathologies in a Novel Transgenic Model. *J Neurosci*. 32(45):15715-27.

Sholl-Franco A, Fragel-Madeira L, Macama Ada C, Linden R, Ventura AL. 2010. ATP controls cell cycle and induces proliferation in the mouse developing retina. *Int J Dev Neurosci*, 28(1):63-73.

Slezak M, Grosche A, Niemiec A, Tanimoto N, Pannicke T, Munch TA, Crocker B, Isope P, Hartig W, Beck SC, Huber G, Ferracci G, Perraut M, Reber M, Miehe M, Demais V, Leveque C, Metzger D, Szklarczyk K, Przewlocki R, Seeliger M, Sage-Ciocca D, Hirrlinger J, Reichenbach A, Reibel S, Pfrieger FW. 2012. Relevance of exocytotic glutamate release from retinal glia. *Neuron*, 74:405-416.

Ulbis MW, Kampik A, Hamilton AM. 1993. Diabetic retinopathy. Epidemiology, risk factors and staging. *Ophthalmology*, 90(2):197-209.

Uckermann O, Kutzer F, Wolf A, Pannicke T, Reichenbach A, Wiedemann P. 2005. The glucocorticoid triamcinolone acetonide inhibits osmotic swelling of retinal glial cells via stimulation of endogenous adenosine signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 315:1036–1045

Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Buhner E, Pietsch UC, Reichenbach A, Wiedemann P, Uhlmann S, Bringmann A. 2006. Changes in membrane conductance play a pathogenic role in osmotic glial cell swelling in detached retinas. *Am J Pathol*, 169:1990-1998.

Wurm A, Pannicke T, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. 2008. Glial cell-derived glutamate mediates autocrine cell volume regulation in the retina: activation by VEGF. *J Neurochem*, 104:386-399.

Wurm A, Lipp S, Pannicke T, Linnertz R, Farber K, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. 2009. Involvement of A(1) adenosine receptors in osmotic volume regulation of retinal glial cells in mice. *Mol Vis*, 15:1858-1867.

Wurm A, Lipp S, Pannicke T, Linnertz R, Krügel U, Schulz A, Färber K, Zahn D, Grosse J, Wiedemann P, Chen J, Schöneberg T, Illes P, Reichenbach A,

Bringmann A. 2010. Endogenous purinergic signaling is required for osmotic volume regulation of retinal glial cells. *J Neurochem*, 112:1261-1272.

Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Francke M, Hollborn M, Wiedemann P, Reichenbach A, Osborne NN, Bringmann A. 2011. Purinergic signaling involved in Müller cell function in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*, 30(5):324-42

Xu Y, Ola MS, Berkich DA, Gardner TW, Barber AJ, Palmieri F, Hutson SM, LaNoue KF. 2007. Energy sources for glutamate neurotransmission in the retina: absence of the aspartate/glutamate carrier produces reliance on glycolysis in glia. *J Neurochem*, 101:120-131.

Yanoff M, Fine BS, Brucker AJ, Eagle RC Jr. 1984: Pathology of human cystoid macular edema. *Surv Ophthalmol. Suppl*:505-11.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

24.09.2013

Ina Frommherz

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei all denjenigen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich das „Projekt“ Promotion doch nochmal in Angriff genommen, durchgeführt und nun auch zu Ende gebracht habe.

Herrn Prof. Dr. Reichenbach danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung durchzuführen.

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Antje Grosche für die inhaltliche und praktische Betreuung der Promotionsarbeit sowie für die jederzeit kritische und inspirierende Zusammenarbeit. Ohne die stets motivierende und uneingeschränkt geduldige Betreuung, hätte ich mein Ziel wahrscheinlich nicht erreicht.

Bei Herrn Dr. Thomas Pannicke möchte ich mich für die nette und hilfreiche Korrektur der Arbeit sowie die stets vorhandene Bereitschaft, bei weiteren Fragen zu helfen, bedanken.

Herrn Dr. Jens Grosche danke ich für die Bereitstellung der grafischen Darstellungen für die Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Michael Schmeißer für seine Geduld, seine Hilfe bei der grafischen Darstellung der Ergebnisse aber vor allem für seine emotionale Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.